

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Ουσίες φυσικής προέλευσης με αναισθητικές ιδιότητες»

Ιωάννης Καραφέρης

ΒΟΛΟΣ 2013

**UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF AGRICULTURAL SCIENCES
DEPARTMENT OF ICHTHYOLOGY AND AQUATIC
ENVIRONMENT**

POSTGRADUATE MASTER'S THESIS

« natural essences with anaesthetic properties»

Ioannis Karaferis

VOLOS 2013

«Ουσίες φυσικής προέλευσης με αναισθητικές ιδιότητες»

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή :

- 1) **Ελένη Γκολομάζου**, Λέκτορας Ιχθυοπαθολογίας, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Επιβλέπουσα**.
- 2) **Παναγιώτα Παναγιωτάκη**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Υδατοκαλλιεργειών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.
- 3) **Αθανάσιος Εξαδάκτυλος**, Μόνιμος Επίκουρος Καθηγητής, Γενετικής Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.

Στην οικογένειά μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στο να φέρω σε πέρας την παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επιβλέπουσα της εργασίας αυτής, Λέκτορα Ιχθυοπαθολογίας κα Ελένη Γκολομάζου για την πολύτιμη βοήθειά της και τη διαρκή υποστήριξή της, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος, όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής της μεταπτυχιακής διατριβής μου, αποτελούμενη από τους 1) Παναγιώτα Παναγιωτάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, και 2) Αθανάσιο Εξαδάκτυλο, Μόνιμο Επίκουρο Καθηγητή για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την καθοδήγησή τους καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Μενέλαο Κάβουρα για την άμεση και ανιδιοτελή βοήθειά του, καθώς επίσης τον κύριο Μανόλη Μαλανδράκη για την αμέριστη συμπαράστασή του κατά τη διάρκεια του πειράματος. Τους εύχομαι κάθε επιστημονική καταξίωση και προσωπική ευτυχία.

Επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ σ' όλους τους καθηγητές μου που κατά τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου με βοήθησαν να πορευτώ σε νέα μονοπάτια γνώσης στο δρόμο για την αυτοπραγμάτωση.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου για την αμέριστη συμπαράσταση, βοήθεια και προ πάντων κατανόηση και ανοχή, καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αναισθησία χρησιμοποιείται στην ιατρική για την προσωρινή μείωση ή αφαίρεση της αίσθησης, έτσι ώστε να μπορούν να πραγματοποιηθούν επώδυνες διαδικασίες ή χειρουργικές επεμβάσεις. Είναι ουσιαστικά μια αναστρέψιμη κατάσταση που προκαλείται από ουσίες με αναισθητικές ιδιότητες και μπορεί να ανακουφίσει τον πόνο και να μειώσει το άγχος παραλύοντας τους μυς.

Κατά το παρελθόν, έχουν εφαρμοσθεί και άλλες μέθοδοι αναισθησίας εκτός των φαρμακευτικών, όπως ο υπνωτισμός και ο πάγος. Στη σημερινή πρακτική της αναισθησίας, αυτές οι μέθοδοι χρησιμοποιούνται σπανιότατα ή καθόλου.

Ο χειρισμός των υδρόβιων ζώων μέσα και έξω από το φυσικό τους περιβάλλον σχεδόν πάντα περιλαμβάνει καταπόνησή τους. Η καταπόνηση κατά τη διάρκεια της αιχμαλωσίας και του χειρισμού επηρεάζει και τη συμπεριφορά τους και κατά συνέπεια είναι συχνά απαραίτητο να ακινητοποιηθεί το ψάρι πριν γίνει ακόμη και η πιο απλή εργασία, π.χ. η αιμοληψία μπορεί να προκαλέσει ανεπιθύμητο στρες. Τα αναισθητικά περιορίζουν το στρες και εξασφαλίζουν την ευζωία στα υπό μελέτη ζώα. Η επιλογή του αναισθητικού γενικά εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα, το κόστος, την ευκολία στη χρήση, τη φύση της μελέτης και την ασφάλεια του χειριστή. Είναι απαραίτητο να λαμβάνονται υπόψη οι βιολογικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες όταν συγκρίνονται μελέτες σχετικά με το αναισθητικό. Οι βιολογικοί παράγοντες περιλαμβάνουν το είδος, το στάδιο του κύκλου ζωής και την ηλικία, το μέγεθος και το βάρος, την περιεκτικότητα σε λιπίδια, τη σωματική κατάσταση και την υγεία του ζώου. Όλοι αυτοί οι παράγοντες επηρεάζουν το μεταβολισμό και επομένως την αποτελεσματικότητα του αναισθητικού. Επίσης, άλλοι παράγοντες είναι οι περιβαλλοντικοί, όπως η θερμοκρασία και το pH.

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας ήταν η διερεύνηση της επίδρασης των φυσικών αναισθητικών αφ' ενός μέσα από τους χρόνους που διαγράφονται στα στάδια αναισθησίας και ανάνηψης και αφετέρου από το μέγεθος της βλάβης που υφίσταται το DNA του ψαριού, χρησιμοποιώντας τη μοριακή τεχνική Comet Assay.

Για τις ανάγκες του πειράματος που πραγματοποιήθηκε επιλέχθηκε η τσιπούρα (*Sparus aurata*) γιατί αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα εμπορικά εκτρεφόμενα είδη στην Ευρώπη. Στην Ελλάδα υπάρχει σταθερή αύξηση παραγωγής στην υδατοκαλλιέργεια με μεγάλο ποσοστό (περίπου 80%) εξαγωγών και σημαντικό μερίδιο στην ευρωπαϊκή αγορά (2,8%). Σχεδόν το 90% της παραγωγής εστιάζεται στη μεσογειακή τσιπούρα και λαβράκι, στα οποία η Ελλάδα παράγει περίπου το 50% της συνολικής παραγωγής. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 114 τσιπούρες, με βάρος 8,816 – 24,951 g και μέση τιμή (Mean) 15,843 g και, μήκος 8,6 – 14,0 cm και μέση τιμή (Mean) 10,5 cm, προερχόμενα από κλειστό κύκλωμα δεξαμενών. Οι συνθήκες κατά τη διάρκεια του πειράματος ήταν οι ακόλουθες: ιχθυοφόρτιση 1 Kgr/m³, θερμοκρασία 21⁰ C, pH 7,4, συγκέντρωση αμμωνίας 0,5 – 2 ppm, αλατότητα 34, διαλυμένο οξυγόνο 5 – 7 mg/L.

Στη συνέχεια διερευνήθηκαν οι πιο γνωστές ουσίες φυτικής προέλευσης στις οποίες έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες για την επίδρασή τους ως αναισθητικά στους υδρόβιους οργανισμούς. Έτσι δοκιμάστηκαν τα παρακάτω αιθέρια έλαια: αιθέριο έλαιο του φυτού *Aloysia triphylla*, (-λουίζα-), αιθέριο έλαιο του φυτού *Eugenia aromatica*, (-γαρυφαλέλαιο-), αιθέριο έλαιο του φυτού *Origanum vulgare* (-ρίγανη-), αιθέριο έλαιο του φυτού *Melaleuca alternifolia* (-τεϊόδεντρο – tea tree oil), αιθέριο έλαιο του φυτού *Juniperus communis* (-άρκευθος ή αγριοκυπαρίσσι-), αιθέριο έλαιο του φυτού

Cinnamomum zeylanicum (-κανέλα-), ώστε να βρεθεί για το καθ' ένα η ιδανική δόση χορήγησης. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για το κάθε αναισθητικό 5 άτομα τσιπούρας και για 5, 10, και 15 min παραμονής τους στο κάθε αναισθητικό, αντίστοιχα. Καταγράφηκαν οι χρόνοι των σταδίων αναισθησίας και ανάνηψης. Τέλος ανιχνεύθηκαν τα επίπεδα καταπόνησης μέσω της ανίχνευσης του κατακερματισμένου DNA από κύτταρα ήπατος ατόμων τσιπούρας, με τη βοήθεια της μοριακής τεχνικής, "Comet Assay" ή single cell gel electrophoresis – (SCGE), ή ανάλυση κομητών. Δηλαδή, μέρος των ηπατοκυττάρων που απομονώθηκαν εξετάστηκαν απευθείας για την εκτίμηση της γενοτοξικότητας (ex vivo εκτίμηση). Οι εικόνες καταγράφηκαν από κάμερα υψηλής ανάλυσης και προβλήθηκαν σε οθόνη H/Y μέσω του λογισμικού ProgRes Capture Pro 2.1, ενώ η επεξεργασία και ανάλυση των «κομητών» έγινε με το λειτουργικό πρόγραμμα CASP 1.2.3.b1. Τέλος, όλα τα αποτελέσματα που αφορούσαν στους χρόνους αναισθησίας, ανάνηψης, θνησιμότητα και tail moment των κομητών επεξεργάστηκαν με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS statistics 17.0 και με το excel MS office 2010.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν, έδειξαν ποσοστά γενοτοξικότητας σε όλα τα αναισθητικά αλλά με διαφορετικά ποσοστά. Το μικρότερο ποσοστό εμφανίστηκε στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε το φυσικό αναισθητικό *Cinnamomum zeylanicum* (-κανέλα-). Όσον αφορά στους χρόνους αναισθησίας και ανάνηψης, καλύτερη συμπεριφορά έδειξε επίσης το φυσικό αναισθητικό *Cinnamomum zeylanicum* (-κανέλα-).

Λέξεις κλειδιά: ανάλυση κομητών, comet assay, ευζωία, καταπόνηση, στρες, στάδια ανάνηψης, φυσικά αναισθητικά, τρόποι αναισθησίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1.	Τι είναι αναισθησία και γιατί χρειάζεται.....	1
1.2.	Αναισθησία στην υδρόβια ζωή	1
1.3.	Πρωτόκολλο αναισθησίας στα ψάρια	3
1.4.	Αναισθησία ψαριών	3
1.5.	Στάδια αναισθησίας – ανάνηψης ψαριού	4
1.6.	Τα αναισθητικά που χρησιμοποιούνται στους υδρόβιους οργανισμούς	5
1.7.	Κυριότερες αναισθητικές ουσίες φυτικής προέλευσης που χρησιμοποιούνται σε υδρόβιους οργανισμούς.....	6
1.7.1.	Αιθέριο έλαιο του φυτού <i>Eugenia aromatica</i>	9
1.7.2.	Αιθέριο έλαιο του φυτού <i>Aloysia triphylla</i>	13
1.7.3.	Αιθέριο έλαιο του φυτού <i>Melaleuca alternifolia</i>	14
1.7.4.	Αιθέριο έλαιο του φυτού <i>Origanum vulgare</i>	15
1.7.5.	Αιθέριο έλαιο του φυτού <i>Juniperus communis</i>	15
1.7.6.	Αιθέριο έλαιο του φυτού <i>Cinnamomum zeylanicum</i>	16
1.8.	DNA	16
1.9.	Σκοπός της μεταπτυχιακής διατριβής	19
2.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	20
2.1.	Πειραματικά ψάρια	20
2.2.	Ιχθύες και συνθήκες εκτροφής.....	22

2.3.	Μελέτη της συμπεριφοράς των ψαριών κατά την αναισθησία και ανάνηψη και χρονομέτρηση σταδίων.	25
2.4.	Επίδραση της αναισθησίας των ψαριών στην καταπόνηση.	27
2.4.1.	Απομόνωση ηπατοκυττάρων.....	28
2.4.2.	Ανάλυση κομητών (Comet assay).....	30
2.4.3.	Αλκαλική μικρο-γέλη ηλεκτροφόρηση.....	31
2.4.4.	Επίστρωση αγαρόζης σε αντικειμενοφόρο πλάκα	34
2.4.5.	Λύση, ηλεκτροφόρηση και μέτρηση των κομητών.....	35
2.4.6.	Εκτίμηση της βλάβης του DNA - Υπολογισμός της παραμέτρου TM	38
2.4.7.	Στατιστική ανάλυση	39
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	40
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	58
5.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	63
6.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	64
6.1.	Ξένη.....	64
6.2.	Ελληνική	74
6.3.	Ηλεκτρονική.....	74
7.	ABSTRACT	75

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Τι είναι αναισθησία και γιατί χρειάζεται

Η αναισθησία χρησιμοποιείται στην ιατρική για την προσωρινή μείωση ή αφαίρεση της αίσθησης, έτσι ώστε να μπορούν να πραγματοποιηθούν επώδυνες διαδικασίες ή χειρουργικές επεμβάσεις. Είναι ουσιαστικά μια αναστρέψιμη κατάσταση που προκαλείται από ναρκωτικές ουσίες και μπορεί να ανακουφίσει τον πόνο, να μειώσει το άγχος και να παραλύσει τους μυς (Freeman, 2000).

Η αναισθησία περιλαμβάνει αναλγησία, ύπνωση, αμνησία, παράλυση. Κατά τη διάρκεια της επέμβασης, ο αναισθησιολόγος παρακολουθεί συνεχώς την πίεση του αίματος του ασθενή, την αναπνοή και την καρδιά και να ρυθμίζει τα επίπεδα των αναισθητικών αν είναι απαραίτητο.

Κατά το παρελθόν, έχουν εφαρμοσθεί και άλλες μέθοδοι αναισθησίας εκτός των φαρμακευτικών, όπως ο υπνωτισμός και ο πάγος. Στη σημερινή πρακτική της αναισθησίας, αυτές οι μέθοδοι χρησιμοποιούνται σπανιότατα ή καθόλου (Fishbein, 1976).

1.2. Αναισθησία στην υδρόβια ζωή

Ο χειρισμός των υδρόβιων ζώων μέσα και έξω από το φυσικό τους περιβάλλον σχεδόν πάντα περιλαμβάνει σωματική δραστηριότητα του ψαριού. Ο χαρακτηριστικός τους αγώνας κατά τη διάρκεια της αιχμαλωσίας και του χειρισμού επηρεάζει και τη συμπεριφορά τους και κατά συνέπεια είναι συχνά απαραίτητο να ακινητοποιηθεί το ψάρι πριν γίνει ακόμη και η πιο απλή εργασία, π.χ. η αιμοληψία μπορεί να προκαλέσει ανεπιθύμητο στρες. Τα αναισθητικά περιορίζουν το στρες και εξασφαλίζουν την ευζωία

στα υπό μελέτη ζώα (Ashley, 2006). Η επιλογή του αναισθητικού γενικά εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα, το κόστος, την ευκολία στη χρήση, τη φύση της μελέτης και την ασφάλεια του χειριστή. Οι αναισθητικές ουσίες προσλαμβάνονται μέσω των βραγχίων και εισέρχονται γρήγορα στο κυκλοφορικό σύστημα. Είναι απαραίτητο να λαμβάνονται υπόψη οι βιολογικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες όταν συγκρίνονται μελέτες σχετικά με το αναισθητικό. Οι βιολογικοί παράγοντες περιλαμβάνουν το είδος, το στάδιο του κύκλου ζωής και την ηλικία, το φύλο, τη σεξουαλική ωριμότητα, τη φυσική κατάσταση και την κατάσταση της υγείας του, το μέγεθος και το βάρος, την περιεκτικότητα σε λιπίδια, τη σωματική κατάσταση και την υγεία του ζώου. Όλοι αυτοί οι παράγοντες επηρεάζουν το μεταβολισμό και επομένως την αποτελεσματικότητα του αναισθητικού. Επίσης άλλοι παράγοντες είναι οι περιβαλλοντικοί, όπως η θερμοκρασία, το pH και η περιεκτικότητα του νερού στο οποίο διαβιεί σε άλατα, μέταλλα και οξυγόνο. (Τσαντήλας και συν. 2005), (Coyle et al., 2004). Σύμφωνα με τους Marking και Meyer, 1985, τα χαρακτηριστικά του ιδανικού αναισθητικού είναι:

1. χρόνος δράσης μικρότερος των 15 min και προτιμότερο λιγότερο των 3 min
2. χρόνος ανάνηψης μικρός, 5 min ή λιγότερο
3. μη τοξικό για τα ψάρια
4. εύκολο στο χειρισμό και ασφαλές για το χειριστή
5. δεν έχει μόνιμες επιπτώσεις στη φυσιολογία και συμπεριφορά του ψαριού
6. απεκκρίνεται ή μεταβολίζεται γρήγορα και δεν αφήνει κατάλοιπα
7. δεν έχει συσσωρευτικές επιπτώσεις ή προβλήματα από την επανειλημμένη έκθεση σ' αυτό
8. έχει χαμηλό κόστος.

1.3. Πρωτόκολλο αναισθησίας στα ψάρια

Σύμφωνα με τον Gordon J. (2002) δίδονται οι παρακάτω πληροφορίες σχετικά με το πρωτόκολλο αναισθησίας σε ψάρια και αμφίβια.

Ο εξοπλισμός που απαιτείται προκειμένου να εφαρμοστεί η αναισθησία είναι:

1. Αναισθητική ουσία
2. Γάντια
3. Δοχεία για μεταφορά, αναισθησία και ανάνηψη
4. Εξοπλισμός παροχής οξυγόνου.

1.4. Αναισθησία ψαριών

1. Νηστεία ψαριού για 12-24 ώρες πριν την αναισθησία. Αυτό ελαττώνει την περιττωματική μόλυνση και τον κίνδυνο της παλινδρόμησης.

2. Χρήση νερού από το αρχικό δοχείο του ψαριού για τη μεταφορά και την αναισθησία. Αν χρησιμοποιηθεί νερό από άλλη πηγή, πρέπει να γίνει προσεκτικά διπλασιασμός των ποιοτικών παραμέτρων του νερού (χλωρίωση, pH, θερμοκρασία και αμμωνία) του αρχικού δοχείου.

3. Διατήρηση του οξυγόνου σε ικανοποιητικό επίπεδο κατά την καταστολή, αναισθησία και αποκατάσταση.

1.5. Στάδια αναισθησίας – ανάνηψης ψαριού

Στον Πίνακα 1 φαίνονται τα στάδια αναισθησίας (Inger Hilde Zahl et al. 2012).

Πίνακας 1: Στάδια αναισθησίας.

Στάδιο	Επίπεδο	Περιγραφή σταδίου / επιπέδου	Εμφάνιση	Κολυμβητική δραστηριότητα	Ισορροπία	Έλλειψη αντίδρασης	Μυϊκός τόνος	Αναπνοή	Καρδιακός ρυθμός
0		Κανονική	Κανονική	Κανονική	Κανονική	Κανονική	Κανονικός	Κανονική	Κανονικός
I		Ελαφρά νάρκωση	Αποπροσανατολισμένος	Μειωμένη	Κανονική	Λιγότερη από κανονική	Κανονικός	Κανονική	Κανονικός
II		Στάδιο διέγερσης	Ενθουσιασμένο	Αυξημένη	Αγωνίζεται να ισορροπήσει	Κανονική ή υπερβολική	Κανονικός	Ανώμαλη ή αυξημένη	Ακανόνιστος ή αυξημένος
III	1	Ελαφρά αναισθησία	Αναίσθητο	Σταματημένη	Χαμένη	Αντιδρά σε ισχυρά ερεθίσματα αφής	Μειωμένος	Κανονική ή μειωμένη	απλός
	2	Χειρουργική	Αναίσθητο	Σταματημένη	Χαμένη	Καμία	Χαλαρός	Μικρή	Χαμηλός
	3	Βαθεία νάρκωση	Αναίσθητο	Σταματημένη	Χαμένη	Καμία	Κανένας	Ανεπαίσθητη	Χαμηλός
IV		Επικείμενος θάνατος	Ετοιμοθάνατο	Σταματημένη	Χαμένη	Καμία	Κανένας	Σταματημένη	Καρδιακή σύλληψη

Στον Πίνακα 2 φαίνονται τα στάδια ανάνηψης (Keene J L et al. 1998).

Πίνακας 2: Στάδια ανάνηψης.

Στάδια	Συμπεριφορά
1	Επανεμφάνιση κίνησης βραγχοκαλυμμάτων
2	Μερική ανάκτηση ισορροπίας και κολυμβητικής κίνησης
3	Ολική επαναφορά ισορροπίας
4	Επανεμφάνιση κολυμβητικής κίνησης. Απαθής αντίδραση σε εξωτερικά ερεθίσματα
5	Συνολική ανάκαμψη. Κανονική κολύμβηση

Όσον αφορά τη μεταχείριση των ψαριών ακολουθήθηκαν οι παρακάτω κανόνες:

Αφήνεται το ψάρι να φθάσει στο κατάλληλο επίπεδο αναισθησίας για τις προγραμματισμένες διαδικασίες.

Κατά τη διάρκεια αυτών, διατηρείται το δέρμα του ψαριού υγρό και τα βράγχια βυθισμένα ή βρέχονται διαρκώς με οξυγονωμένο νερό.

Κατά τη διάρκεια της αναισθησίας αξιολογείται ο ρυθμός αναπνοής και το χρώμα των βραγχίων.

Αν η αναπνοή επιβραδύνεται ή σταματά, τοποθετείται το ψάρι στο νερό που είναι ελεύθερο αναισθητικού για ανάνηψη μέχρι η αναπνοή να επανέλθει.

1.6. Τα αναισθητικά που χρησιμοποιούνται στους υδρόβιους οργανισμούς

Για την αναισθησία των υδρόβιων ζώων χρησιμοποιούνται κυρίως συνθετικές χημικές ουσίες (da Cunha 2010):

A. Χημικές

Tricaine

Methanesulfonate

Benzocaine

Etomidate

Metomidate

2-phenoxyethanol

Quinaldine

B. Φυσικές

Eugenia aromatica

Lippia alba

Aloysia triphylla

Dianthus caryophyllus

Ocimum gratissimum

Erythrophleum suaveolens

Nicotiana tabacum

Melaleuca alternifolia

Datura innoxia

1.7. Κυριότερες αναισθητικές ουσίες φυτικής προέλευσης που χρησιμοποιούνται σε υδρόβιους οργανισμούς

Τα φυτά έχουν χρησιμοποιηθεί από τον άνθρωπο για τις φαρμακευτικές τους αξίες για χιλιάδες χρόνια. Οι επιστήμονες έχουν ανακαλύψει φυτικής προέλευσης αλκαλοειδή ευεργετικά για τη χρήση των γενικών και τοπικών αναισθητικών. Αν και έχουν ενοχοποιηθεί για τις ιδιότητές τους από τους ανθρώπους, ως αναισθητικά έχουν μεγάλη σημασία στον τομέα της ιατρικής για την καταστολή της εγκεφαλικής δραστηριότητας, τη λειτουργία των νεύρων και των μυών για τον έλεγχο του πόνου. Έχει αποδειχθεί η σημασία τους για χρήση κατά τη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης (Fishbein 1976).

Κατά την ελληνική αρχαιότητα μία σειρά βοτάνων και παρασκευασμάτων χρησιμοποιούνταν ως παυσίπονα, κατά των νευραλγιών, ως υπνωτικά και κατευναστικά (Μυρωνίδου-Τζουβελέκη και συν. 2009). Ένας σύντομος κατάλογος των κυριότερων από αυτά, αλφαβητικά, έχει ως εξής:

- Άνηθος (*Anethum graveolens*)
- Γλυκισίδα (*Pimpinella anisum*)
- Γλυκύρριζα (*Glycyrrhiza glabra*)
- Δίκταμο (*Origanum dictamnus*)
- Έρπυλλος (*Thymus serpyllum*)
- Κώνειον (*Conium maculatum*)
- Μανδραγόρας (*Mandragoras officinarum*)
- Μήκων (*Papaver somniferum*)
- Μηκωνίς (*Euphorbia exiqua ή vetusa*)
- Νάρδος (*Nardus stricta*)
- Νάρθηξ (*Ferula communis*)
- Πήγανον: Σύμφωνα με το Διοσκουρίδη διακρίνονται δύο είδη:
 (α) Απήγανος (*Ruta graveolens*): Αντισπασμωδικό και κατευναστικό του νευρικού συστήματος, συστατικό της θηριακής, που ήταν αντίδοτο δηλητηρίων και (β) Αγριοπήγανος (*Ruta Montana*)
- Υοσκύαμος (*Hyoscyantus albus*)

Κατά τον 2^ο μ.Χ. αι. στην Κίνα ένας διάσημος ιατρός, ο Hua Tuo είχε επινοήσει το αναισθητικό «ma fei». Αν και οι αρχαίες συνταγές έχουν χαθεί, πιστεύεται ότι μεταξύ των συστατικών ήταν η κάνναβις (*Cannabis indica*) και το φυτό *Datura Innoxia*, που είναι παραισθησιογόνο (Tubbs *et al.* 2011).

Κατά το μεσαίωνα, δεν υπάρχει ένδειξη ότι οι γιατροί είχαν στη διάθεσή τους τη γενική αναισθησία για τους ασθενείς που χειρουργούνταν. Η βιβλιογραφία που αφορά στη γενική αναισθησία κατά το μεσαίωνα αναφέρεται στον υπνωτικό σπόγγο «spongia somnifera». Αυτός ο «υπνωτικός σπόγγος» είχε σύνθεση που βοηθούσε τον

ασθενή να κοιμηθεί και να μην αισθανθεί τον πόνο. Αποτελούνταν από ένα μίγμα όπιου, χυμού των φύλλων μανδραγόρα, πράσινο χυμό κώνιου, χυμό του φυτού *Hyosciamus niger*. Παρόλα αυτά δεν υπάρχει καμία βιβλιογραφική ένδειξη ότι ο υπνωτικός σπόγγος ήταν αποτελεσματικός για αναισθησία (Prioreschi 2003).

Αποδεικτικά στοιχεία για την ανακούφιση από τον πόνο και την καταστολή για χειρουργικούς και ιατρικούς σκοπούς εντοπίστηκαν σε ιατρικές πραγματείες από τους Ρωμαϊκούς και Βυζαντινούς χρόνους (2ος αι. π.Χ. έως 7ο αι. μ.Χ.). Ρωμαίοι και Βυζαντινοί επιστήμονες όπως ο Διοσκουρίδης Πεντάνιος, ο Γάιος Πλίνιος Σεκούντους, ο Γαληνός κ.ά. αναφέρονται στα φυτά *Mandragoras officinarum*, *Hyoscyamos niger* και *Atropa belladonna* ως τα πλέον σημαντικά βότανα εκτός από το όπιο παπαρούνας (*Papaver Somniferum*), που χρησιμοποιούνται για καταστολή και ανακούφιση πόνου (Ramoutsaki et al. 2002).

Σύμφωνα με τις παραπάνω αναφορές συμπληρωματικά τα αναισθητικά που χρησιμοποιούνταν στην αρχαιότητα ήταν τα παρακάτω:

- *Datura Innoxia*
- *Cannabis indica*
- *Conium maculatum*
- *Hyoscyamos niger*
- *Atropa belladonna*
- *Papaver somniferum*

Σήμερα, από τα φυσικά αναισθητικά που χρησιμοποιούνται στην υδρόβια ζωή, ιδιαίτερης μνείας χρήζει το γαρυφαλέλαιο, για το οποίο έχουν εκπονηθεί οι περισσότερες μελέτες, πολλές από τις οποίες αναφέρονται παρακάτω.

1.7.1. Αιθέριο έλαιο του φυτού *Eugenia aromatica*

Βασίλειο : Plantae

Τάξη : Myrtales

Οικογένεια : Myrtaceae

Γένος : *Eugenia*

Είδος : *aromatic*



Εικόνα 1: φυτό *Eugenia aromatica*

Το γαρυφαλέλαιο λαμβάνεται από απόσταξη των λουλουδιών, μίσχων και φύλλων του φυτού *Eugenia aromatica* ή *caryophyllata* (Εικ.1). Εκτός από την ευρεία χρήση του ως αρωματικό των τροφών, έχει χρησιμοποιηθεί για αιώνες ως τοπικό αναλγητικό στην οδοντιατρική (Chaieb 2007). Θεωρείται καλύτερο από άλλα αναισθητικά όπως κιναιδίνη, βενζοκαΐνη και τρικαΐνη, το οποίο είναι το μόνο εγκεκριμένο αναισθητικό για ψάρια στις ΗΠΑ. Το γαρυφαλέλαιο είναι ένα φυτικό προϊόν, πιο φθινό και πιο αποτελεσματικό από άλλα αναισθητικά για ψάρια. Είναι ασφαλές για τον άνθρωπο (Munday 1997). Έχει χρησιμοποιηθεί με ασφάλεια στον άνθρωπο, τα θηλαστικά, τα ψάρια και τα αμφίβια (Mitchell 2009).

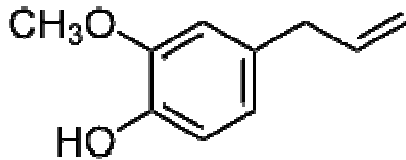
Το γαρυφαλέλαιο είναι πιο κατάλληλο για χρήση σε εμπορικές υδατοκαλλιέργειες, όπου τα αναισθητικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μεγάλες ποσότητες από ανειδίκευτους εργάτες.

Το γαρυφαλέλαιο είναι ένα μίγμα από ενώσεις: phenolic eugenol (ευγενόλη) (Εικ.2), το οποίο αποτελεί το 85-90% των ενεργών συστατικών, isoeugenol και methyleugenol. Άλλα σημαντικά αιθέρια έλαια του γαρυφαλέλαιου είναι acetyl

eugenol, beta-caryophyllene και vanillin, crategolic, acid tannins, gallotannic acid, methyl salicylate, flavonoids eugenin, kaempferol, rhamnetin και eugenitin; triterpenoids όπως oleanolic acid, stigmasterol και campesterol, καθώς και μερικά sesquiterpenes. Στο εμπόριο το γαρυφαλέλαιο έχει περίπου 84% ευγενόλη, αλλά μπορεί κανείς να βρει και 100% ευγενόλη. Το γαρυφαλέλαιο και η ευγενόλη είναι ημιδιαλυτά στο νερό, ιδιαίτερα στις χαμηλές θερμοκρασίες.

Το γαρυφαλέλαιο έχει ταχύτερη δράση και συνεχόμενη αναισθησία συγκρινόμενο με άλλα αναισθητικά, αλλά μεγαλύτερο χρόνο αποκατάστασης. Άλλα πλεονεκτήματα είναι η αποτελεσματικότητα σε ένα φάσμα θερμοκρασιών, η διαθεσιμότητα, το χαμηλό κόστος και η ασφάλεια του χειριστή.

Αν και οι κλινικές μελέτες έχουν δείξει αναλγητικές επιδράσεις στον άνθρωπο, δεν υπάρχουν τέτοιες αποδείξεις για τα ψάρια.



Εικόνα 2: Ευγενόλη

Η ουσία ευγενόλη παράγεται επίσης από το φυτό *Coluria geoides* (family Rosaceae) που ευδοκμεί στη Σοβιετική Ένωση και κυρίως στην Ουκρανία (Olzowska and Furmanowa 1993).

Εφαρμογές του αιθέριου ελαίου του φυτού *Eugenia aromatica*. Η ευγενόλη σε σύγκριση με άλλα αναισθητικά.

Η δύναμη της ευγενόλης ως αναισθητικού αποδεικνύεται μελετώντας τα συμπεράσματα από εργασίες που πραγματοποιήθηκαν και χρησιμοποίησαν γαρυφαλέλαιο σε σύγκριση και με άλλα αναισθητικά. Έτσι σύμφωνα με την εργασία του Filiciotto (2012), προέκυψε ότι η ευγενόλη είναι αποτελεσματικό αναισθητικό, καθώς και δεν επηρεάζει τις αιματολογικές παραμέτρους στην περίπτωση του λαυρακιού. Ωστόσο η έκθεση σε αναισθητικά είναι δυνατό να προκαλεί στρες, σύμφωνα με τους Weber et al. (2011). Όμως συγκριτικά προτείνεται το γαρυφαλέλαιο ως αναισθητικό, γιατί έχει καλύτερα αποτελέσματα απ ότι άλλα χημικά αναισθητικά στις κολυμβητικές επιδόσεις (Anderson et al. 1997). Επίσης σύμφωνα με τους (Oliveira et al. 2009), φαίνεται ότι το χλωριούχο νάτριο και το γαρυφαλέλαιο είναι ικανοποιητικά αναισθητικά μεταφορά ψαριών, με το χλωριούχο νάτριο σ αυτή την περίπτωση να προτείνεται ως πιο οικονομικό. Μια άλλη συγκριτική έρευνα που έγινε για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας του γαρυφαλέλαιου ως αναισθητικού σε νεαρά λαυράκια (*Dicentrarchus labrax*) και τσιπούρες (*Sparus aurata*) σε σύγκριση με τη φαινοξυαιθανόλη (Mylonas et al. 2005), έδειξε ότι το γαρυφαλέλαιο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αποτελεσματικό αναισθητικό σε 10 φορές περίπου μικρότερες δόσεις από τη φαινοξυαιθανόλη. Όμως χρειάζεται περισσότερη έρευνα πριν να προταθεί για εμπορική χρήση. Όσον αφορά τη σύγκριση της ευγενόλης με την ηλεκτρονάρκωση, σύμφωνα με τους Renault et al. (2011), προκύπτει ότι δεν ενδείκνυται η ευγενόλη για αναισθησία στο ευρωπαϊκό χέλι *Anguilla anguilla* γιατί επηρεάζει την κορτιζόλη, ενώ η ηλεκτρονάρκωση είναι αποδεκτή.

Επίσης η ευγενόλη είναι ένα κατάλληλο αναισθητικό, για την αναισθησία του χρυσόψαρου (*Carassius auratus*) (Peng 2011). Η ευγενόλη είναι ένα ικανοποιητικό αναισθητικό σύμφωνα με τους επιστήμονες για την υδρόβια ζωή, όπως προκύπτει από μελέτες για την τοξικότητά της (Doleželová et al. 2011). Παρ' όλα αυτά, είναι απαραίτητο να γίνονται τεστ τοξικότητας πριν τη χρήση του γαρυφαλέλαιου στα ψάρια για αναισθησία, γιατί κάθε είδος ψαριού έχει διαφορετική ευαισθησία. Η αλλοίωση της γεύσης των ψαριών που προορίζονται για κατανάλωση, είναι ένα θέμα το οποίο έχει ήδη μελετηθεί (da Cunha et al. 2010), μετά από οργανοληπτική ανάλυση και έχει αποδειχθεί ότι είναι δυνατό να επηρεάσει τη γεύση. Το γεγονός όμως αυτό πρέπει να μελετηθεί περισσότερο γιατί πολλοί παράγοντες μπορεί να εμπλέκονται όπως η συγκέντρωση του αναισθητικού. Επίσης το μεταβολικό στρες δε μειώθηκε τελείως με την ευγενόλη, σύμφωνα με τους Inoue et al. (2011) στο ψάρι *Tambaquis* που είναι το κύριο ψάρι στις υδατοκαλλιέργειες του Δυτικού Αμαζονίου. Κάτι όμως που χρειάζεται περαιτέρω έρευνα.

Η θερμοκρασία είναι ένας παράγοντας που μπορεί να επηρεάσει τα στάδια της αναισθησίας. Σύμφωνα με μια μελέτη για την επίδραση της θερμοκρασίας κατά την αναισθησία με γαρυφαλέλαιο στο ψάρι του γένους *Platichthys flesus*, οι αυξομειώσεις της θερμοκρασίας δεν επέδρασαν στην καταστολή, αλλά υψηλότερη θερμοκρασία ελάττωσε το χρόνο ανάνηψης (Akbulut et al. 2012).

Επίσης υπάρχουν αποτελέσματα που δείχνουν ότι αναισθησία με υψηλότερες συγκεντρώσεις διαλύματος γαρυφαλέλαιου σε μικρό χρόνο προτιμώνται από χαμηλότερες συγκεντρώσεις και μεγαλύτερο χρόνο (Hoseini et al. 2011α, Hoseini et al. 2011β).

Όσον αφορά την ισοευγενόλη κατά την αξιολόγησή της για αναισθησία στον κυπρίνο *Cyprinus carpio*, έχει αποδειχθεί ότι είναι ασφαλής (Gladden et al. 2010). Επίσης, σύμφωνα με τους Iversen et al. (2012), στην περίπτωση του χελιού (*Anguilla anguilla* L.) προέκυψε ότι η ισοευγενόλη είναι πολλά υποσχόμενη και, αν χρησιμοποιηθεί καλά μπορεί να βελτιώσει την ευζωία των ζώων.

1.7.2. Αιθέριο έλαιο του φυτού *Aloysia triphylla*

Βασίλειο :	Plantae
Τάξη :	Lamiales
Οικογένεια :	Verbenaceae
Γένος :	<i>Aloysia</i>
Είδος :	<i>triphylla</i>



Εικόνα 2: *Aloysia triphylla*

Το φυτό *Aloysia triphylla* (Verbenaceae) (Εικ.3) φύεται φυσικά στη Νότια Αμερική και στην Ευρώπη ήρθε το 17^ο αι. Στην παραδοσιακή ιατρική χρησιμοποιήθηκε σαν θεραπευτικό της αϋπνίας και άγχους. Πρόσφατα το αιθέριο έλαιο του φυτού αυτού έχει καθιερωθεί ως αναισθητικό για την υδρόβια ζωή. Έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Parodi et al. 2012).

Εφαρμογές του αιθέριου ελαίου του φυτού *Aloysia triphylla*

Από τα αποτελέσματα της εργασίας των Parodi et al. (2012) για την αξιολόγηση της αναισθητικής ικανότητας του αιθέριου ελαίου του φυτού *Aloysia triphylla* και *Lippia alba*, προέκυψε ότι είναι αποτελεσματικά και επιπλέον βελτιώνουν το αντιοξειδωτικό σύστημα στις γαρίδες (*Litopenaeus vannamei*).

1.7.3. Αιθέριο έλαιο του φυτού *Melaleuca alternifolia*

Βασίλειο :	Plantae
Τάξη :	Myrtales
Οικογένεια :	Myrtaceae
Γένος :	<i>Melaleuca</i>
Είδος :	<i>alternifolia</i>



Εικόνα 3: *Melaleuca alternifolia*

Ένα ενδιαφέρον αιθέριο έλαιο που χρησιμοποιείται ευρέως στην εναλλακτική ιατρική στην Αυστραλία είναι το αιθέριο έλαιο τειϊόδενδρου (Kristoffersen *et al.* 1996), που είναι γνωστό ότι έχει διάφορες φαρμακευτικές ιδιότητες, όπως αντιβακτηριδιακές, αντιμυκητιακές, αναλγητικές κ.λπ. Προέρχεται από την απόσταξη σε ατμό των φύλλων και των άκρων των κλαδιών του φυτού *Melaleuca alternifolia* (Εικ. 4) και αποτελείται κυρίως από terpinen-4-ol, γ-terpinene, α-terpinene, 1,8-cineole και άλλα (Hajek 2011). Δεν πρέπει να συγχέεται με το φυτό *Camellia oleifera*.

Εφαρμογές του αιθέριου ελαίου του φυτού του *Melaleuca alternifolia*

Κατά τη μελέτη της χρήσης του ελαίου του τειϊόδεντρου σαν αναισθητικό στον κυπρίνο (Hajek 2011), προέκυψε αποτελεσματικότητα του αιθέριου ελαίου του τειϊόδενδρου σαν αναισθητικό στον κυπρίνο (*Cyprinus carpio*). Το αιθέριο αυτό έλαιο έδειξε αναισθητικές ιδιότητες, πληρώνοντας τις βασικές προϋποθέσεις για ένα αναισθητικό ψαριών.

1.7.4. Αιθέριο έλαιο του φυτού *Origanum vulgare*

Βασίλειο :	Plantae
Τάξη :	Lamiales
Οικογένεια :	Lamiaceae
Γένος :	<i>Origanum</i>
Είδος :	<i>vulgare</i>



ilgare

Για το αιθέριο έλαιο του φυτού *Origanum vulgare* (Εικ. 5) έχουν αναφερθεί φαρμακευτικές ιδιότητες όχι όμως και για αναισθητικές ιδιότητες στα ψάρια.

1.7.5. Αιθέριο έλαιο του φυτού *Juniperus communis*

Βασίλειο :	Plantae
Τάξη :	Pinales
Οικογένεια :	Cupressaceae
Γένος :	<i>Juniperus</i>
Είδος :	<i>communis</i>



Juniperus

Για το αιθέριο έλαιο του φυτού *Juniperus communis* (Εικ.6) έχουν αναφερθεί φαρμακευτικές ιδιότητες όχι όμως και για αναισθητικές ιδιότητες στα ψάρια.

1.7.6. Αιθέριο έλαιο του φυτού *Cinnamomum zeylanicum*

Βασίλειο :	Plantae
Τάξη :	Laurales
Οικογένεια :	Lauraceae
Γένος :	<i>Cinnamomum</i>
Είδος :	<i>zeylanicum</i>



Εικόνα 6: *Cinnamomum zeylanicum*

Για το αιθέριο έλαιο του φυτού *Cinnamomum zeylanicum* (Εικ.7) έχουν αναφερθεί φαρμακευτικές ιδιότητες όχι όμως και για αναισθητικές ιδιότητες στα ψάρια.

1.8. DNA

Το πόσο καλό είναι ένα αναισθητικό φαίνεται αφ' ενός από τους χρόνους που διαγράφονται στα στάδια αναισθησίας και ανάνηψης και αφετέρου στο μέγεθος της βλάβης που υφίσταται το DNA του ψαριού.

Είναι γνωστό ότι δεν υπάρχει άλλο μόριο, εκτός από το DNA, του οποίου η ακεραιότητα να είναι τόσο ζωτική για τη ζωή του κυττάρου. Κατά τη διάρκεια της ζωής κάθε οργανισμού, τα κύτταρα του εκτίθενται σε πληθώρα μέσων που έχουν τη δυνατότητα να προκαλέσουν βλάβες στο DNA τους και να προκαλούν μεταλλάξεις. Οι τροποποιήσεις αυτές του DNA πολλές φορές έχουν ως τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία μεταλλάξεων ή την καταστροφή του DNA που οδηγεί το κύτταρο στην απόπτωση (προγραμματισμένος θάνατος) ή ακόμη και τον μετασχηματισμό των φυσιολογικών κυττάρων σε καρκινικά.

Οποιαδήποτε παρέκκλιση από τη συνηθισμένη δομή της διπλής έλικας στο DNA χαρακτηρίζεται ως βλάβη και αποτελεί απειλή για το κύτταρο ή/και τους απογόνους του, καθώς μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση μεταλλάξεων. Μπορούμε να χωρίσουμε τέτοιες αλλαγές σε δύο γενικές κατηγορίες:

Αλλαγές μιας βάσης επηρεάζουν την αλληλουχία, αλλά όχι και τη γενική δομή του DNA. Επίσης δεν επηρεάζουν τη μεταγραφή και την αντιγραφή, διαδικασίες κατά τις οποίες οι κλώνοι του DNA είναι διαχωρισμένοι. Οι επιβλαβείς επιπτώσεις των αλλαγών αυτού του είδους εκδηλώνονται σε επόμενες κυτταρικές γενεές, μέσω των αλλαγών που επιφέρουν στην αλληλουχία του DNA. Αλλαγές στην αλληλουχία του DNA μπορεί να προκύψουν ως αποτέλεσμα *in situ* τροποποίησης μιας βάσης ή ακόμα από σφάλματα κατά την αντιγραφή του DNA. Για παράδειγμα, η απαμίνωση της κυτοσίνης σε ουρακίλη (είτε αυθόρμητα είτε λόγω επίδρασης μεταλλαξιογόνων παραγόντων) δημιουργεί ένα αταίριαστο ζεύγος U-G. Ένα σφάλμα κατά την αντιγραφή μπορεί να εισάγει μια αδερίνη αντί για μια κυτοσίνη, δημιουργώντας ένα ζεύγος A-G. Παρόμοιες συνέπειες μπορεί να προκληθούν από την ομοιοπολική σύνδεση μιας μικρής χημικής ομάδας σε μια βάση, γεγονός που μεταβάλλει την ικανότητα να σχηματίζει ζεύγη. Τέτοιου είδους μετατροπές μπορεί να προκληθούν από μία πολύ μικρή δομική παραμόρφωση (όπως στην περίπτωση του ζεύγους U-G) έως και μια αρκετή σημαντική βλάβη (όπως στην περίπτωση του ζεύγους A-G). Το κοινό χαρακτηριστικό τους είναι ότι οι αταίριαστες βάσεις παραμένουν μόνο μέχρι την επόμενη αντιγραφή. Επομένως υπάρχει περιορισμένος χρόνος για να επιδιορθωθεί το σφάλμα, πριν αυτό οδηγήσει στην εμφάνιση ενός μεταλλαγμένου μορίου DNA μετά την αντιγραφή.

Οι δομικές παραμορφώσεις μπορεί να αποτελούν φυσικά εμπόδια της αντιγραφής ή της μεταγραφής. Ο σχηματισμός ομοιοπολικών δεσμών ανάμεσα σε

βάσεις ενός κλώνου ή ανάμεσα σε βάσεις των απέναντι κλώνων αναστέλλει την αντιγραφή και τη μεταγραφή. Η υπερϊώδης ακτινοβολία επάγει το σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών ανάμεσα σε δύο γειτονικές βάσεις θυμίνης πάνω στον ένα κλώνο. Παρόμοιες επιπτώσεις μπορεί να έχει η προσθήκη μιας ογκώδους χημικής ομάδας σε μια βάση που θα παραμορφώσει τη δομή της διπλής έλικας. Επίσης, μια εγκοπή σε έναν κλώνο ή απομάκρυνση μιας βάσης, δεν επιτρέπει σε αυτή την περιοχή του κλώνου να λειτουργήσει ως μήτρα για τη σύνθεση DNA ή RNA. Το κοινό χαρακτηριστικό όλων αυτών των αλλαγών είναι ότι η βλάβη παραμένει στο DNA, συνεχίζοντας να διαταράσσει τη δομή και/ή να προκαλεί την εμφάνιση μεταλλάξεων μέχρι να αφαιρεθεί. Χωρίς έναν αποτελεσματικό μηχανισμό επιδιόρθωσης αυτών των βλαβών του DNA, αυτές θα οδηγούσαν με βεβαιότητα στο γενετικό θάνατο των φορέων τους. Ευτυχώς κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, δημιουργήθηκαν αρκετοί επιδιορθωτικοί μηχανισμοί οι οποίοι μπορούν να επιδιορθώσουν τις βλάβες αυτές και να αντιστρέψουν τις δυσμενείς επιπτώσεις τόσο των φυσικών όσο και των τεχνητών μεταλλάξεων. Οι μηχανισμοί αυτοί χωρίζονται σε αυτούς που είναι υπεύθυνοι για την άμεση εξουδετέρωση των επιβλαβών παραγόντων, όπως ορισμένα ενζυμικά συστήματα που είναι επιφορτισμένα με την εξουδετέρωση των παραγόντων προτού αυτοί φτάσουν και αντιδράσουν με το γενετικό υλικό και σ' αυτούς που επιλαμβάνονται εφόσον το DNA έχει υποστεί βλάβη (φωτοενεργοποίηση, επιδιόρθωση εκτομής, επιδιόρθωση ανασυνδυασμού και επιδιόρθωση 808).

Η ανάλυση κομητών ή "Comet Assay" ή single cell gel electrophoresis – (SCGE), είναι μια τεχνική ανίχνευσης του κερματισμένου DNA σε απομονωμένα κύτταρα, σε μικρο-γέλη ηλεκτροφόρηση. Ονομάζεται έτσι λόγω του χαρακτηριστικού σχήματος που παρατηρείται, σε περίπτωση μεγάλης έκτασης βλάβης, κατά την έξοδο

του κερματισμένου DNA από τον πυρήνα και το κύτταρο και τη μετακίνησή του προς την άνοδο.

Ο κομήτης που παρατηρείται κατά την ανάλυση της εικόνας αποτελείται από κεφαλή και ουρά. Η περιοχή της κεφαλής αντιπροσωπεύει το DNA που δε μεταναστεύει έξω από τον πυρήνα, ενώ στην ουρά βρίσκονται θραύσματα του DNA που εξέρχονται από τον πυρήνα και το κυτταρικό σώμα. Ανάλογα με τις συνθήκες, ελέγχεται αν η βλάβη αφορά το μονόκλωνο ή δίκλωνο DNA. Σε αλκαλικό περιβάλλον γίνεται η αποπεριέλιξη και η μετουσίωση του DNA και ανιχνεύεται η βλάβη στο μονόκλωνο, ενώ σε ουδέτερο, δε λαμβάνει χώρα η μετουσίωση, και επομένως, ανιχνεύονται οι βλάβες της διπλής αλυσίδας. Η λύση των κυττάρων γίνεται σε ουδέτερο ή αλκαλικό περιβάλλον και η συνδεόμενες στο DNA πρωτεΐνες απομακρύνονται, ώστε να μην παρεμβάλλονται κατά τη μετανάστευση στο ηλεκτρικό πεδίο. Η έκπλυση του πηκτώματος σε διαλύματα κατάλληλου pH συντελεί στην απομάκρυνση και άλλων ιόντων, που ενδεχομένως μεταβάλλουν τις συνθήκες της ηλεκτροφόρησης.

Δεδομένου ότι το ποσό του DNA είναι ανάλογο της έντασης φθορισμού και σε συνδυασμό με τη χρήση ειδικών λογισμικών, είναι δυνατή η εκτίμηση της βλάβης του DNA, με τη βοήθεια ορισμένων παραμέτρων όπως: η ποσοστιαία αναλογία των κυττάρων με ουρά, η εκατοστιαία αναλογία του DNA στην ουρά και το μήκος της ουράς.

1.9. Σκοπός της μεταπτυχιακής διατριβής

Αντικείμενο της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας ήταν η διερεύνηση της επίδοσης των φυσικών αναισθητικών αφ' ενός μέσα από τους χρόνους που

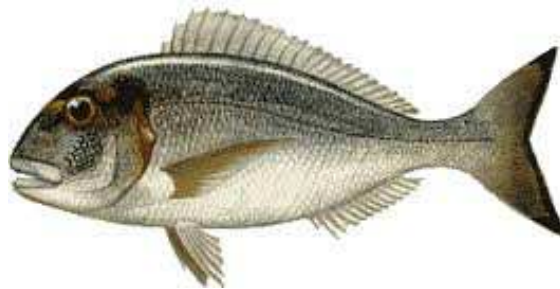
διαγράφονται στα στάδια αναισθησίας και ανάνηψης και αφετέρου από το μέγεθος της βλάβης που υφίσταται το DNA του ψαριού, χρησιμοποιώντας τη μοριακή τεχνική Comet Assay.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Πειραματικά ψάρια

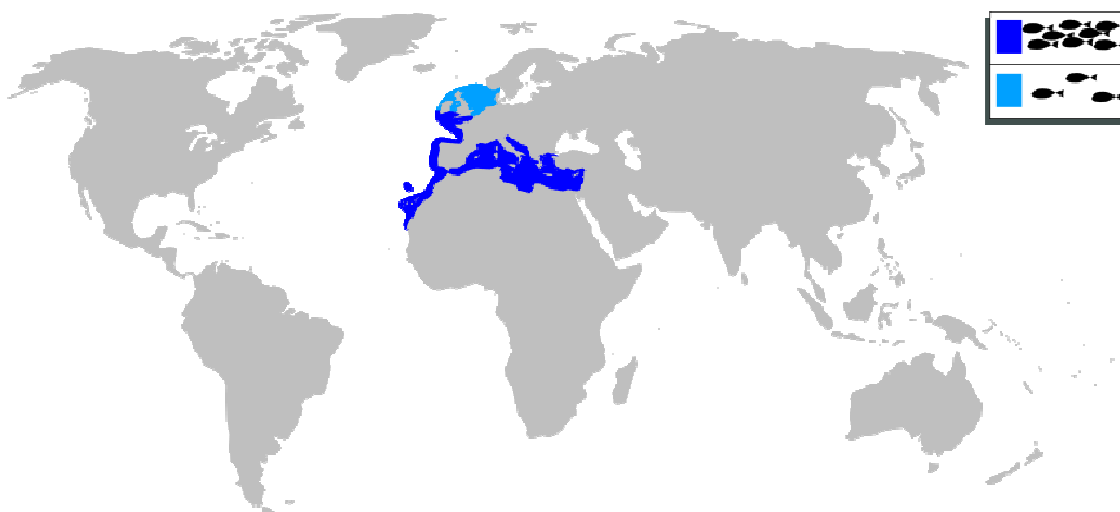
Το είδος ψαριού που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν η τσιπούρα (*Sparus aurata*, Linnaeus 1758) (Εικ. 8), η ακριβής κατάταξη του οποίου είναι η παρακάτω:

Βασίλειο:	Ζώα
Συνομοταξία :	Χορδωτά
Υποσυνομοταξία:	Σπονδυλωτά
Ομοταξία :	Οστεϊχθύες
Υφομοταξία (κλάση) :	Ακτινοπτερύγιοι
Υπέρταξη:	Τελεόσταιοι
Τάξη:	PERCIFORMES
Οικογένεια:	SPARIDAE
Γένος	<i>Sparus</i>
Είδος	<i>aurata</i>



Εικόνα 7: *Sparus aurata*

Η τσιπούρα είναι κατεξοχήν ευρύαλο και ευρύθερμο είδος και ανήκει στην οικογένεια των Sparidae. Η βαθυμετρική κατανομή φτάνει για τα μεν ιχθύδια τα 30 μέτρα και για τα ενήλικα άτομα τα 150 μέτρα. Η χωρική κατανομή στον Ατλαντικό περιορίζεται μέχρι τα Κανάρια νησιά και το Cape Verde, ενώ σποραδικές εμφανίσεις αναφέρονται μέχρι και τις ακτές της Μ. Βρετανίας και τη Μαύρη θάλασσα (Bauchot and Hureau, 1986). Η διατροφή της στηρίζεται σε δίθυρα και καρκινοειδή (Breber and Strada, 1995). Παρουσιάζει προτίμηση στις λιμνοθάλασσες και σε παράκτια συστήματα με αμμώδεις βυθούς και με λειμώνες Ποσειδωνίας (*Posidonia oceanica*) (Fischer *et al.*, 1987) (Εικ. 9). Πολύ συχνά παρατηρούνται άτομα να σκάβουν την άμμο με το κεφάλι τους για την εύρεση της τροφής. Μετακινείται σε βαθύτερα νερά κατά την περίοδο της αναπαραγωγής τέλη φθινοπώρου με χειμώνα. Τα ενήλικα άτομα επιστρέφουν στα ρηχά αμέσως μετά την αναπαραγωγή, ενώ αργότερα επιστρέφει ο γόνος που παραμένει μέχρι τη σεξουαλική ωρίμανση.



Εικόνα 9: Περιοχή κατανομής *S. aurata* των άγριων πληθυσμών (θαλασσί) και των χωρών παραγωγής (μπλε) (Chavanne *et al*, 2008).

Στη Μεσόγειο και στη Μαύρη θάλασσα, η οικογένεια των Sparidae αντιπροσωπεύεται από 26 είδη συμπεριλαμβανομένων και δύο ειδών με προέλευση την Ερυθρά θάλασσα που εγκαταστάθηκαν στην λεκάνη της ανατολικής Μεσογείου λόγω της διάνοιξης της διώρυγας του Σουέζ. Η εκτροφή της τσιπούρας γίνεται σε λίμνες με υφάλμυρο ή θαλασσινό νερό και σε λιμνοθάλασσες. Η μαζική παραγωγή όμως, γίνεται σε κλωβούς διαφόρων μεγεθών και τύπων στη θάλασσα. Πολλές Μεσογειακές χώρες εκτρέφουν τσιπούρα, με την Ελλάδα την Τουρκία και την Ισπανία να παράγουν το 70% της συνολικής μεσογειακής παραγωγής. Τα τελευταία 35 χρόνια η εκτροφή τσιπούρας γνώρισε άνθηση. Σημαντικός στόχος είναι η αύξηση της παραγωγής και η βελτίωση της ποιότητας της εκτρεφόμενης τσιπούρας για την κάλυψη της ολοένα αυξανόμενης παγκόσμιας ζήτησης σε υψηλής ποιότητας πρωτεΐνες, σε συνδυασμό με τα αρνητικά αποτελέσματα της υπεραλίευσης. Αυτή η επιτυχία είναι αποτέλεσμα των προγραμμάτων έρευνας κι ανάπτυξης των χωρών της περιοχής, σε συνδυασμό με την ισχυρή ζήτηση της αγοράς.

2.2. Ιχθύες και συνθήκες εκτροφής

Την περίοδο Ιανουάριος – Οκτώβριος 2012, 300 άτομα τσιπούρας διατηρήθηκαν σε οκτώ δεξαμενές θαλασσινού νερού κλειστού κυκλώματος. Τσιπούρες μέσου μήκους 10,5 cm και μέσου βάρους 15,843 g προερχόμενες από μονάδα εντατικής εκτροφής ψαριών διατηρήθηκαν σε δεξαμενές θαλασσινού νερού κλειστού κυκλώματος. Τα ψάρια αυτά εκτέθηκαν σε έξι διαφορετικά αναισθητικά και χρησιμοποιήθηκαν με τυχαία σειρά όλες οι δεξαμενές. Τα φυσικά αναισθητικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το αιθέριο έλαιο του φυτού *Aloysia triphylla*, (-λουίζα-), το αιθέριο έλαιο του φυτού *Eugenia aromatica*, (-γαρυφαλέλαιο-), το αιθέριο έλαιο του φυτού *Origanum vulgare* (-ρίγανη-), το αιθέριο έλαιο του φυτού *Melaleuca alternifolia* (-τεϊόδεντρο – tea tree oil),

το αιθέριο έλαιο του φυτού *Juniperus communis* (-άρκευθος ή αγριοκυπαρίσσι-), και το αιθέριο έλαιο του φυτού *Cinnamomum zeylanicum* (-κανέλα-). Οι εγκαταστάσεις που εκτελέστηκε το πείραμα ήταν του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο Φυτόκο (Εικ. 10).



Εικόνα 10: Χώρος αναισθησίας και ανάνηψης.

Οι συνθήκες κατά τη διάρκεια του πειράματος ήταν οι κάτωθι:

Ιχθυοφόρτιση: 1kg/m^3 , Θερμοκρασία: $21\text{ }^{\circ}\text{C}$, Οξύτητα: pH 7,4, Συγκέντρωση αμμωνίας (NH_3): 0,5-2 ppm, Αλατότητα: 34 psu, Διαλυμένο οξυγόνο: 5-7 ml/ L.

Η ιχθυοφόρτιση διατηρήθηκε σταθερή σε όλες τις δεξαμενές. Τα ψάρια διατηρήθηκαν στις πειραματικές εγκαταστάσεις για δύο μήνες (-από 18/7/2012 έως 16/9/2012-) πριν την έναρξη των πειραμάτων. Τα ψάρια σιτίζονταν με βιομηχανική τροφή (biomar) μία φορά την ημέρα.

Ο τύπος δεξαμενών που χρησιμοποιήθηκε για τη διατήρηση των ψαριών ήταν κυλινδρικές δεξαμενές, οι οποίες έχουν ένα κεντρικό σημείο απορροής του νερού στη βάση τους και η είσοδος του νερού αυτού γινόταν συνήθως υπό πίεση από κάποιο σημείο της περιφέρειάς τους. Πριν χρησιμοποιηθεί το κύκλωμα οι δεξαμενές και οι σωληνώσεις, καθαρίστηκαν με ξύδι και νερό, απολυμάνθηκαν με διάλυμα χλωραμίνης και εκπλύθηκαν με νερό. Για την τεχνητή οξυγόνωση του νερού δύο αεραντλίες εναλλασσόταν ανά μία ώρα, με την βοήθεια χρονοδιακόπτη, οι δεξαμενές στην περίμετρό τους, περιείχαν αεριστήρες διάχυσης αέρα (αερόπετρες), παρέχοντας μικρή ανάδευση της στήλης του νερού. Οι τιμές του διαλυμένου οξυγόνου, καταγράφονταν με τη χρήση οξυγονόμετρου (Hanna hi 9143). Η ικανότητα ανανέωσης του νερού γινόταν με τη βοήθεια δύο αντλιών, συνδεδεμένων παράλληλα με την παροχή να είναι της τάξης των $2 \text{ m}^3/\text{h}$ περίπου. Αλλαγή του νερού και καθαρισμός των δεξαμενών γίνονταν όταν αυτή κρινόταν σκόπιμη ανά τακτικά χρονικά διαστήματα, κατά μέσο όρο δύο φορές την εβδομάδα. Η αλατότητα μετριοίταν δύο φορές τη βδομάδα και κυμαινόταν από 34 σε 37 psu (αλατόμετρο WTW LF 330). Η θερμοκρασία του νερού κατά τη διάρκεια της μελέτης κυμάνθηκε από 21 έως 22 °C. Οι τιμές του pH και της αμμωνίας κυμάνθηκαν σε φυσιολογικά επίπεδα. Για τη μέτρηση των επιπέδων αμμωνίας χρησιμοποιήθηκε το τεστ NH_3/NH_4 TETRA TEST. Για να διασφαλισθεί η ποιότητα του συστήματος, το νερό ανακυκλωνόταν μέσω των αντλιών σε ειδικό σύστημα διήθησης (Tetra Pond PF 10.000), όπου διηθούνται $2 \text{ m}^3/\text{h}$ θαλασσινού νερού.

Οι ιχθύες πριν την εισαγωγή τους στις δεξαμενές εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα χλωραμίνης συγκέντρωσης 2-3 ppm για την απολύμανσή τους από τυχόν παθογόνους μικροοργανισμούς και στη συνέχεια εκπλύθηκαν με καθαρό θαλασσινό νερό προτού μεταφερθούν στις δεξαμενές. Πριν το στάδιο έκθεσης των ιχθύων στις συγκεντρώσεις

αναισθητικών μέρος αυτών με τυχαία προέλευση από τις δεξαμενές του κυκλώματος, μεταφέρθηκε σε εξωτερικές, οξυγονούμενες δεξαμενές όπου και παρέμεινε μέχρι τη δειγματοληψία. Την ημέρα πριν τη μεταφορά τους και μέχρι τη δειγματοληψία τους παρέμειναν άσιτα.

2.3. Μελέτη της συμπεριφοράς των ψαριών κατά την αναισθησία και ανάνηψη και χρονομέτρηση σταδίων.

Αρχικά έγιναν δοκιμές σε τσιπούρες ώστε να βρεθεί για το καθ' ένα αναισθητικό η ιδανική δόση χορήγησης (Marking and Meyer 1985). Επειδή δε παρατηρήθηκε ότι τα αιθέρια έλαια διαλύονταν δύσκολα στο θαλασσινό νερό όπου μετά θα εμβυπνίζονταν οι τσιπούρες, προτιμήθηκε να διαλύεται πρώτα το αιθέριο έλαιο σε δεκαπλάσιο όγκο ακετόνης και το διάλυμα αυτό στη συνέχεια να ρίχνεται στο θαλασσινό νερό. Έτσι για το αιθέριο έλαιο του φυτού *Aloysia triphylla*, (-λουίζα-) η ιδανική δόση βρέθηκε 200 μl/L, για το αιθέριο έλαιο του φυτού *Cinnamomum zeylanicum* (-κανέλα-) η ιδανική δόση βρέθηκε 40 μl/L, για το αιθέριο έλαιο του φυτού *Eugenia aromatica*, (-γαρυφαλέλαιο-) η ιδανική δόση βρέθηκε 40 μl/L, (Sajan *et al.* 2012, Gladden *et al.* 2010), για το αιθέριο έλαιο του φυτού *Juniperus communis* (-άρκευθος ή αγριοκυπαρίσσι-) η ιδανική δόση βρέθηκε 900 μl/L, για το αιθέριο έλαιο του φυτού *Origanum vulgare* (-ρίγανη-) η ιδανική δόση βρέθηκε 50 μl/L, για το αιθέριο έλαιο του φυτού *Melaleuca alternifolia* (-τεϊόδεντρο-) η ιδανική δόση βρέθηκε 200 μl/L. Για δόσεις μικρότερες από τις παραπάνω τα άτομα τσιπούρας αργούσαν να αναισθητοποιηθούν και για δόσεις μεγαλύτερες από αυτές αυξάνονταν κατά πολύ το ποσοστό θνησιμότητας. Επίσης, πραγματοποιήθηκε μεταχείριση σε καθαρό θαλασσινό

νερό, χωρίς τη χρήση αναισθητικού. Κάθε εξωτερική δεξαμενή που περιείχε αναισθητικό οξυγονώνονταν καθώς επίσης και οι δεξαμενές που χρησίμευαν για ανάνηψη. Για κάθε ένα αναισθητικό χρησιμοποιήθηκαν 15 τσιπούρες. Τα 5 από αυτά παρέμειναν στο αναισθητικό για 5 min, τα 5 για 10 min και τα υπόλοιπα 5 για 15 min. Σε κάθε περίπτωση μετρήθηκαν οι χρόνοι αναισθησίας και ανάνηψης και βιντεοσκοπήθηκαν (Εικ. 11). Μετά από την αναισθησία και την ανάνηψη τα ψάρια ρίχνονταν σε άλλες δεξαμενές και παρακολουθούνταν ώστε να μετρηθεί το ποσοστό θνησιμότητας. Έτσι παρατηρήθηκε η θνησιμότητα για 24, 48, 72, 96, 120, 144 ώρες.



Εικόνα 11: Αναισθησία τσιπούρας.

2.4. Επίδραση της αναισθησίας των ψαριών στην καταπόνηση.

Οι μεταχειρήσεις που μελετήθηκαν ήταν οι ακόλουθες. Κάθε τσιπούρα αναισθητοποιούνταν στα αναισθητικά που περιγράφηκαν πιο πάνω και στις αντίστοιχες δόσεις. Επιπροσθέτως πραγματοποιήθηκε μεταχείριση σε καθαρό θαλασσινό. Η αναισθησία διήρκησε 10 min επειδή παρατηρήθηκε πως σε αυτό το χρόνο τα ψάρια στο σύνολό τους πέφτουν σε χειρουργική αναισθησία. Για κάθε μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν τρία ψάρια. Μετρήθηκαν οι χρόνοι αναισθησίας και τα ψάρια θανατώθηκαν. Επιτόπου, αμέσως μετά την θανάτωση, τα άτομα μετρήθηκαν (Εικ.12), ζυγίστηκαν (Εικ.13) και έγινε εκτομή για την αφαίρεση του ήπατος.



Εικόνα 12: Μέτρηση μήκους

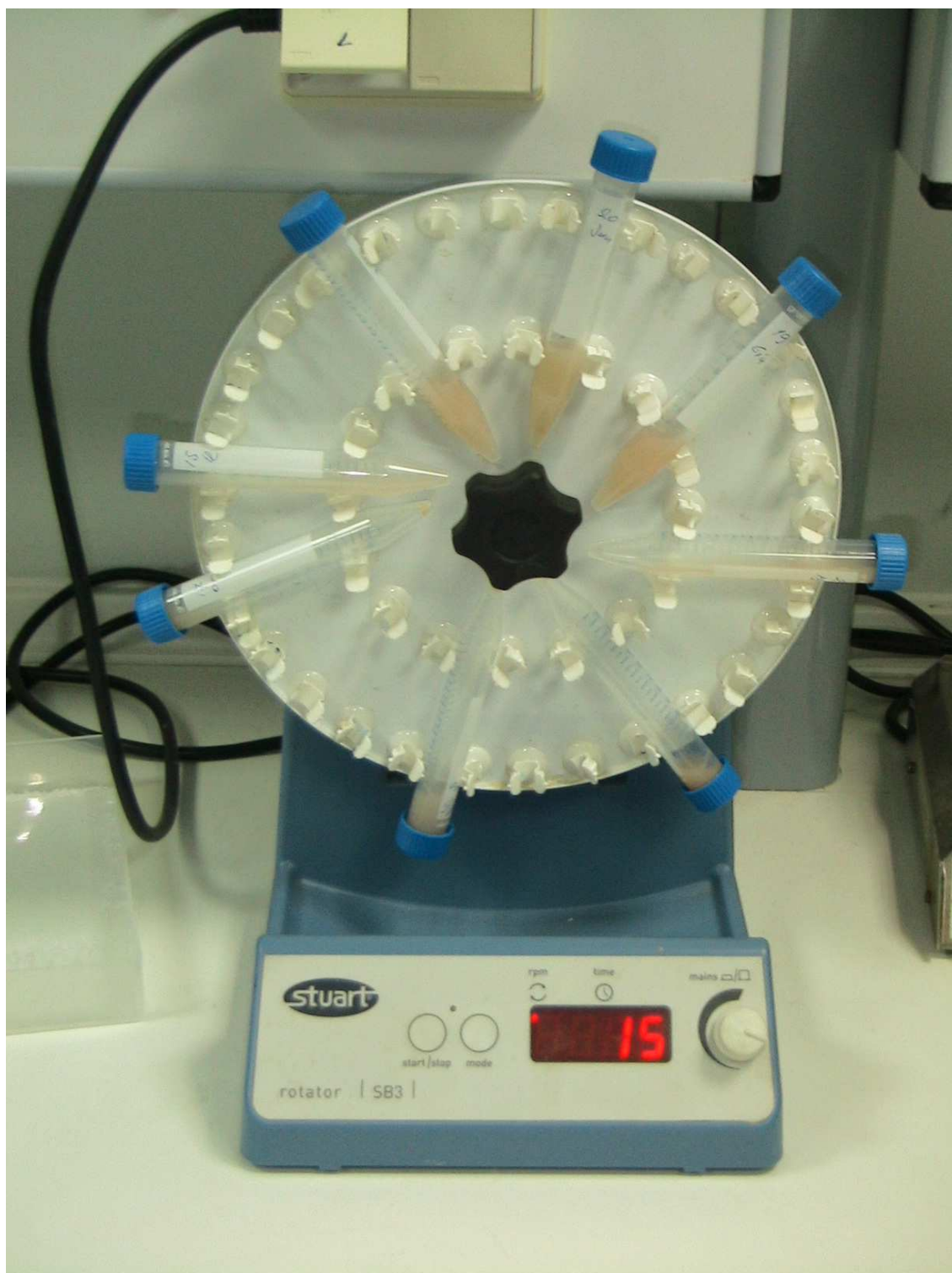


Εικόνα 13: Μέτρηση βάρους

Τα υπό εξέταση όργανα, άμεσα μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες τύπου «Falcon» που περιείχαν ρυθμιστικό διάλυμα HBSS (Hank's Balanced salt solution) και τοποθετήθηκαν πάνω στο πάγο μέχρι να μεταφερθούν στο εργαστήριο για την απομόνωση των ηπατοκυττάρων. Το διάλυμα HBSS είναι ελεύθερο ασβεστίου και μαγνησίου. Το ασβέστιο επιδρά ανασταλτικά στο διαχωρισμό των κυττάρων του ιστού, ενώ το μαγνήσιο αναστέλλει τη δράση της κολλαγονάσης (Baksi and Frazier, 1990).

2.4.1. Απομόνωση ηπατοκυττάρων

Η διαδικασία απομόνωσης κυττάρων που ακολουθήθηκε στη συγκεκριμένη εργασία περιλάμβανε δύο στάδια (Baksie and Fazier, 1990: Devauχ et al., 1997: Mitchelmore and Chirpman, 1998): Στο πρώτο στάδιο, έγινε ο καθαρισμός του ιστού με διαδοχικές πλύσεις με το ρυθμιστικό διάλυμα HBSS ελεύθερο ασβεστίου-μαγνησίου (Ca ή Mg) και στο δεύτερο, έλαβε χώρα η αφομοίωση του ήπατος. Αμέσως μετά τον καθαρισμό του ιστού, εφαρμόστηκαν ενέσεις κολλαγονάσης (CLS, type I) συγκέντρωσης 0,04% (κολλαγονάση σε διάλυμα HBSS). Η κολλαγονάση είναι ένζυμο το οποίο βοηθάει στην αφομοίωση ήπατος. Αφού παρέμεινε ο ιστός για 15 min σε διάλυμα HBSS, το ήπαρ μεταφέρθηκε σε δισκίο "petri", όπου τεμαχίστηκε σε μικρά τμήματα. Η όλη διαδικασία έλαβε χώρα πάνω σε τριμμένο πάγο. Το τεμαχισμένο ήπαρ μαζί με διάλυμα HBSS, μεταφέρθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα τύπου «Falcon», και τοποθετήθηκε σε μηχανήμα ανάδευσης “rotator” στις 15 στροφές/min για μισή ώρα (Εικ. 14).



Εικόνα 14: μηχανήμα ανάδευσης

Στη συνέχεια, το περιεχόμενο του δοχείου μεταφέρθηκε σε άλλο δοκιμαστικό σωλήνα τύπου «Falcon», αφού πρώτα φιλτραρίστηκε με αποστειρωμένη γάζα και συμπληρώθηκε με HBSS μέχρι τελικό όγκο 5 ml. Ακολούθησε φυγοκέντριση του αιωρήματος των κυττάρων στις 2.000 στροφές πέντε min σε θερμοκρασία 40°C και μετά την αφαίρεση του υπερκείμενου κρατήθηκε το pellet και προστέθηκε φρέσκο διάλυμα HBSS μέχρι τελικό όγκο πάλι 5 ml. Επαναλήφθηκαν δύο διαδοχικές πλύσεις με HBSS (φυγοκέντριση στις 2.000 στροφές για πέντε min) και τέλος το εναπομείναν pellet αναμίχθηκε σε 5ml ρυθμιστικού διαλύματος PBS (phosphate buffered saline). Η ποσότητα του διαλύματος PBS που προστέθηκε υπολογίστηκε ώστε η τελική συγκέντρωση των βιώσιμων κυττάρων να είναι 100.000/ml. Ο υπολογισμός του αριθμού των βιώσιμων κυττάρων έγινε με χρώση ηωσίνης συγκέντρωσης 4% (5μl χρωστικής σε περίπου 45 μl κυτταρικού αιωρήματος) και καταμέτρησή τους σε αντικειμενοφόρο πλάκα Neubauer.

2.4.2. Ανάλυση κομητών (Comet assay)

Η ανάλυση κομητών ή comet assay (ή single - cell gel) είναι μια αρκετά ευαίσθητη τεχνική που επιτρέπει την ανίχνευση της βλάβης του DNA σε επίπεδο απομονωμένων κυττάρων. Σ' αυτή τη τεχνική της μικρο-γέλης ηλεκτροφόρησης, ένας μικρός αριθμός κυττάρων, όπως κύτταρα που προέρχονται από καλλιέργειες ή κύτταρα που απομονώνονται από διάφορους ιστούς, τοποθετούνται με τη μορφή αιωρήματος σε λεπτό στρώμα αгарόζης πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Τα κύτταρα λύνονται από διάλυμα κορεσμένο σε άλας NaCl. Σχηματίζονται πυρήνες αποτελούμενοι από μη νουκλεοσωμικό αλλά υπερελικωμένο DNA. Ακολούθως της ηλεκτροφόρησης και της χρώσης τους με τη φθορίζουσα ουσία, βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr), τα κύτταρα με βλάβη

στο DNA, εμφανίζουν αυξημένη μετανάστευση του κερματισμένου χρωμοσωμικού DNA από τον πυρήνα προς την άνοδο, λαμβάνοντας το σχήμα του κομήτη (Σχ 1). Η εφαρμογή της μεθόδου σε αλκαλικό περιβάλλον είναι η πιο συχνή και το ποσοστό των θραυσμάτων που μεταναστεύουν, είναι ανάλογο της βλάβης του DNA. Μεταξύ των παραμέτρων χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση του ποσοστού του κερματισμένου, είναι η εκατοστιαία αναλογία του DNA στην ουρά του κομήτη, η εκατοστιαία αναλογία του DNA στον πυρήνα, το μήκος της ουράς, η διάμετρος πυρήνα, το συνολικό μήκος του κομήτη και η παράμετρος TM-Tail Moment, όπου ορίζεται ως το γινόμενο του μήκους της ουράς, επί το ποσοστό DNA στην ουρά του κομήτη και η οποία χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ως μέτρο κερματισμού το DNA.

2.4.3. Αλκαλική μικρο-γέλη ηλεκτροφόρηση

Η αλκαλική εκδοχή της μεθόδου "comet assay" εφαρμόστηκε από τους Singh *et al.*, (1988), εκτελώντας ηλεκτροφόρηση σε $\text{pH} > 13,0$, κατέστη δυνατή η ανίχνευση θραυσμάτων μονόκλωνου DNA. Άλλες εκδοχές της μεθόδου αναπτύχθηκαν από τον Olive, (1989) που περιλάμβανε τη λύση των κυττάρων σε αλκαλικό pH , και στη συνέχεια ηλεκτροφόρηση είτε σε ουδέτερο είτε σε ελαφρώς αλκαλικό περιβάλλον (pH 12,1), για την ανίχνευση θραυσμάτων δίκλωνου ή μονόκλωνου DNA αντίστοιχα. Επειδή οι περισσότεροι τοξικοί παράγοντες που επηρεάζουν το DNA, προκαλούν περισσότερες και πιο εκτεταμένες βλάβες σε τμήματα στον έναν από τους δύο κλώνους απ' ότι στις ίδιες θέσεις στο δίκλωνο μόριο, η αλκαλική εκδοχή της μεθόδου ($\text{pH} > 13$) είναι πιο ευαίσθητη στην ανίχνευση της βλάβης του DNA.

Ένα ευρύ φάσμα τοξικών παραγόντων προκαλεί αύξηση της μετανάστευσης του DNA έξω από το κυτταρικό σώμα, μέσα στο πήκτωμα της αγαρόζης. Εγκοπές που

εισάγονται στο μόριο του DNA, είτε από τη δράση ενδονουκλεασών των μηχανισμών επιδιόρθωσης είτε απευθείας από γενοτοξικούς, παράγοντες, προκαλούν θραύσματα ή χάλαση του υπερελικωμένου DNA. Τα θραύσματα και οι θηλιές (χαλαρωμένο DNA) μπορούν να μεταναστεύσουν προς την άνοδο σχηματίζοντας κατ' αυτό τον τρόπο την ουρά του κομήτη. Οι αλκαλικές συνθήκες επιτρέπουν την αποπεριέλιξη και τη μετουσίωση του δίκλωνου DNA αποκαλύπτοντας τις ενδεχόμενες εγκοπές στο μόριο, προκαλώντας έτσι τη δημιουργία θραυσμάτων. Η μέθοδος δεν ανιχνεύει μόνο τις βλάβες που προκαλούνται στο DNA από την ιονίζουσα ακτινοβολία ή αντίστοιχες χημικές ενώσεις, αλλά και αυτές που προκαλούνται από το υπεροξείδιο του υδρογόνου, τις ελεύθερες ρίζες, τους αρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAHs), διάφορες χημικές ουσίες, τα βαρέα μέταλλα και την υπεριώδη ακτινοβολία (Tice R. 1995). Επιπρόσθετα είναι άμεσα ανιχνεύσιμη η θραύση του μορίου που προκαλείται από διαδικασίες που εισάγουν εγκοπές στον ένα κλώνο όπως κατά την επιδιόρθωση εκτομής, η οποία σε ορισμένες περιπτώσεις, π.χ. UV, PAHs, φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο (Speit and Hartmann, 1995).

Επιπλέον βλάβη του DNA σε ειδικές αλληλουχίες βάσεων μπορούν να ανιχνευθούν σε συνδυασμό της μεθόδου με ειδικές ενδονουκλεάσες (ένζυμα περιορισμού). Μετά τη λύση των κυττάρων, η εφαρμογή των προαναφερθέντων ενζύμων προσβάλλουν φωσφοδιεστερικούς δεσμούς που περιβάλλονται από εξειδικευμένες αλληλουχίες βάσεων και τα παραγόμενα θραύσματα μετρούνται μέσω της τεχνικής. Οξειδωμένες βάσεις DNA ανιχνεύτηκαν με πολλή μεγάλη ευαισθησία με τη βοήθεια της ενδονουκλεάσης III ή το ένζυμο formamidopyrimidine- DNA-glycosylase (FPG) in vivo και in vitro (Collins *et al.*, 1993; Dennog *et al.*, 1996). Άλλοι τύποι βλαβών του DNA, όπως ο σχηματισμός διμερών μεταξύ πυριμιδίνων, μπορούν να

ανιχνευτούν εφαρμόζοντας την τεχνική έμμεσου ανοσοφθορισμού με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων (Sauvaigo *et al.*, 1998). Ο συνδυασμός της comet assay με τη FISH (fluorescence in situ hybridization) καθιστά δυνατή τη μελέτη της επαγωγής και διατήρησης της βλάβης του DNA σε ειδικές περιοχές στα χρωμοσώματα και στα γονίδια. (Santos *et al.*, 1997, Rapp *et al.*, 2000).

Σύνδεση μεταξύ των μορίων DNA και DNA-πρωτεϊνών μπορούν να προκαλέσουν προβλήματα στην εφαρμογή της μεθόδου, επειδή σταθεροποιείται το χρωμοσωμικό DNA και εμποδίζει την μετανάστευσή του (Hartmann *et al.*, 1995). Η τεχνική της «ανάλυσης κομητών» βρίσκει εφαρμογή στην ανίχνευση αυτών των δεσμών. Ένας τρόπος είναι η πρόκληση θραυσμάτων και κατά συνέπεια η επαγωγή της μετανάστευσης του DNA με ένα δεύτερο παράγοντα (π.χ. ιονίζουσα ακτινοβολία) και η σύγκρισή της με τη μετανάστευση που προκαλείται με την παρουσία του παράγοντα που προκαλεί τους δεσμούς μεταξύ των μορίων DNA και DNA-πρωτεϊνών (Pfuhler *et al.*, 1996, Merk *et al.*, 1998). Επιπλέον η παράταση του χρόνου μετουσίωσης ή/και του χρόνου της ηλεκτροφόρησης, επιτρέπει τη σύγκριση της μετανάστευσης του DNA και επομένως την ανίχνευση ύπαρξης των προαναφερθέντων δεσμών. Η διάκριση DNA-DNA και DNA-πρωτεϊνών δεσμών μπορεί να γίνει με την εφαρμογή της πρωτεϊνάσης K (PK) στα λυμένα κύτταρα πριν την ηλεκτροφόρηση. Η PK διασπά τους δεσμούς μεταξύ DNA και πρωτεϊνών, ενώ δεν έχει επίδραση στους δεσμούς DNA-DNA (Fuscoe *et al.*, 1996).

2.4.4. Επίστρωση αγαρόζης σε αντικειμενοφόρο πλάκα

Μετά την απομόνωση των ηπατικών κυττάρων, ακολούθησε η τοποθέτησή τους με τη μορφή αιωρήματος (20μL) σε λεπτή στρώση αγαρόζης πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα ως εξής. Πρώτα, η αντικειμενοφόρος πλάκα είχε εμβαπτισθεί σε καθαρή αλκοόλη και στη συνέχεια τοποθετήθηκε στους -20°C για 20 min. Πήκτωμα αγαρόζης (NMP Normal Melting Point) συγκέντρωσης 0,5% παρασκευάστηκε σε διάλυμα PBS. Μετά την ανάδυσή και την ομογενοποίηση του, το διάλυμα τοποθετήθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων για μικρό χρονικό διάστημα (5 min) μέχρι να διαυγασθεί πλήρως. Αφού στέγνωσε η αντικειμενοφόρος πλάκα από την αιθανόλη, εμβαπτίστηκε στη ζεστή αγαρόζη (>60° C) για σύντομο χρονικό διάστημα (3-4 sec), ώστε να επικαθίσει στην κρύα και καθαρή επιφάνειά της. Αμέσως, αφαιρέθηκε η αγαρόζη, καθαρίστηκε προσεκτικά η κάτω επιφάνειά της και τοποθετήθηκε πάνω σε πάγο για να ζελατινοποιηθεί. Ένα δεύτερο διάλυμα, αγαρόζης (LMP Low Melting Point) συγκέντρωσης 0,5% παρασκευάστηκε με τον ίδιο τρόπο, για την ανάμιξή του με το κυτταρικό αιώρημα. Όταν έφτασε σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C), 20μl κυτταρικού αιωρήματος προστέθηκαν σε 80μl αγαρόζης (LMP) και τοποθετήθηκαν στην αντικειμενοφόρο πλάκα που ήταν καλυμμένη με πήκτωμα αγαρόζης και τοποθετήθηκε η καλυπτρίδα. Στο σημείο αυτό χαμηλώνουμε τα φώτα. Η αντικειμενοφόρος πλάκα που έφερε τα κύτταρα τοποθετήθηκε σε πάγο για 30 min. Μετά τη ζελατινοποίηση και της δεύτερης στρώσης αγαρόζης, η καλυπτρίδα απομακρύνθηκε με προσοχή.

2.4.5. Λύση, ηλεκτροφόρηση και μέτρηση των κομητών

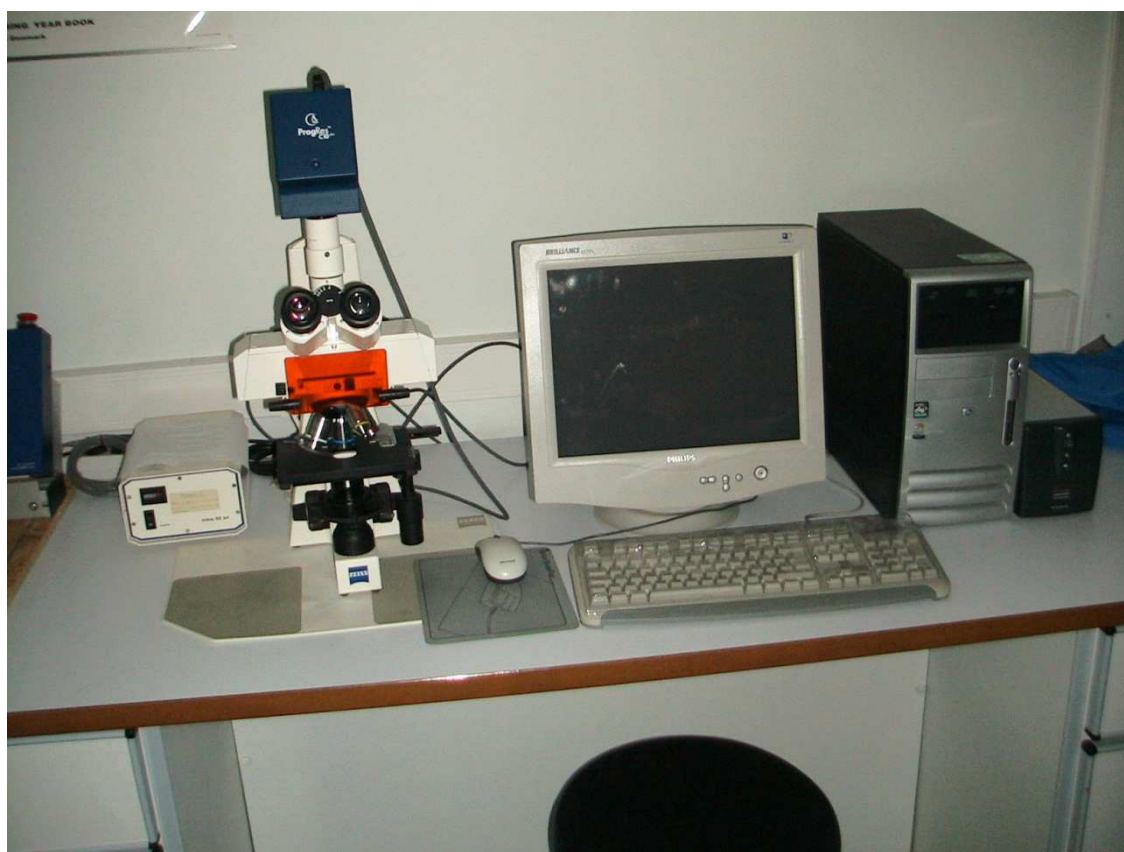
Μετά το τέλος του προηγούμενου σταδίου, η αντικειμενοφόρος πλάκα τοποθετήθηκε σε διάλυμα λύσης. Το διάλυμα περιείχε άλας NaCl συγκέντρωσης 2,5 M, EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) συγκέντρωσης 100 mM, Tris συγκέντρωσης 10 mM και τέλος προστίθενται 1 % Triton - X 100 και 10% DMSO (dimethyl sulfoxide). Στη συνέχεια, το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε με συμπυκνωμένο διάλυμα HCl ή NaOH (pH 10) και τοποθετήθηκε στους 4 °C για περίπου 30 min (το κρύο διάλυμα βοηθάει στη διατήρηση της σταθερότητας της αгарόζης) (Tice *et al.*, 2000). Στο κρύο διάλυμα λύσης, τοποθετήθηκαν οι αντικειμενοφόρες πλάκες (οι οποίες φέρουν τα ηπατικά κύτταρα) και παρέμειναν στους 4 °C για τουλάχιστον μία ώρα. Κατά το ανωτέρω χρονικό διάστημα έλαβε χώρα η λύση των κυττάρων καθώς η κυτταρική μεμβράνη λύεται και το DNA σχηματίζει πυρήνες. Πριν την ηλεκτροφόρηση, οι αντικειμενοφόρες πλάκες εκπλύθηκαν με απεσταγμένο νερό και τοποθετήθηκαν στη συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης που περιείχε 1,5L βασικό διάλυμα (pH>12,1 & 4°C), όπου και παρέμειναν για 15 min ώστε να πραγματοποιηθεί η αποδιάταξη του DNA που είναι απαραίτητη για την ανίχνευση θραυσμάτων μονόκλωνου DNA.



Εικόνα 15: Συσκευή ηλεκτροφόρησης.

Το παραπάνω διάλυμα παρασκευάστηκε από 0,075 M NaOH και 1 mM EDTA σε απεσταγμένο νερό. Μετά την πάροδο των 15 min, ξεκίνησε η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης (εικ.15) σε συνθήκες 25 V, 300 mA για χρονική διάρκεια 15 min (Mitchelmore and Chipman, 1998). Στη συνέχεια, οι αντικειμενοφόρες πλάκες εκπλύθηκαν με προσοχή σε ουδέτερο διάλυμα (διάλυμα Tris 0,4 M), ώστε το βρωμιούχο αιθίδιο να μπορεί να δράσει κατά το στάδιο της χρώσης (McKeIvey-Martin *et al.*, 1993). Σε κάθε αντικειμενοφόρο, προστέθηκαν 50μl βρωμιούχου αιθιδίου συγκέντρωσης 20μg/ml. Εκατό έως εκατόν πενήντα κύτταρα συλλέχθηκαν τυχαία από κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα τα οποία αναλύθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού (Zeiss

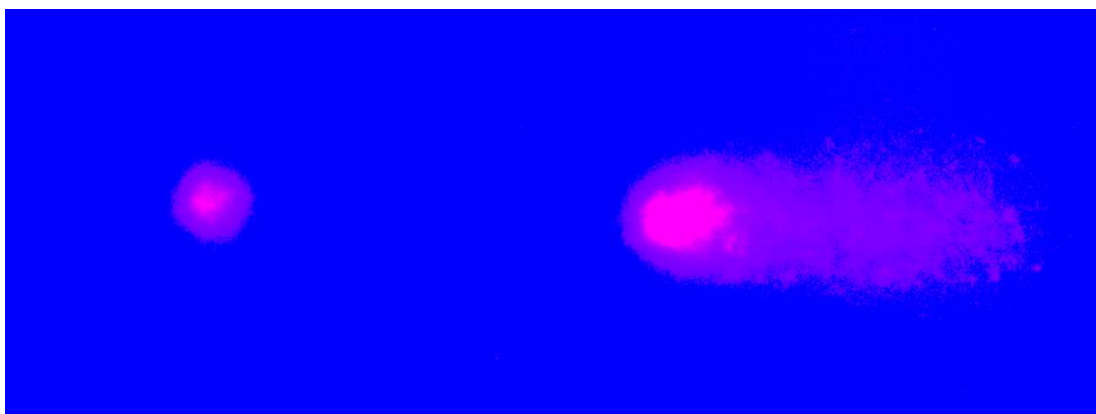
Axiostar plus) εφοδιασμένο με φίλτρο διέγερσης και αποκοπής στα 515-560nm 590 nm αντίστοιχα, σε μεγέθυνση 40x. Οι εικόνες καταγράφονταν από βιντεοκάμερα υψηλής ανάλυσης και προβάλλονταν σε οθόνη Η/Υ μέσω του λογισμικού ProgRes Capture Pro 2.1 (εικ.16), ενώ η επεξεργασία-ανάλυση των «κομητών» έγινε με το λειτουργικό πρόγραμμα CASP (Konca *et al.*, 2003).



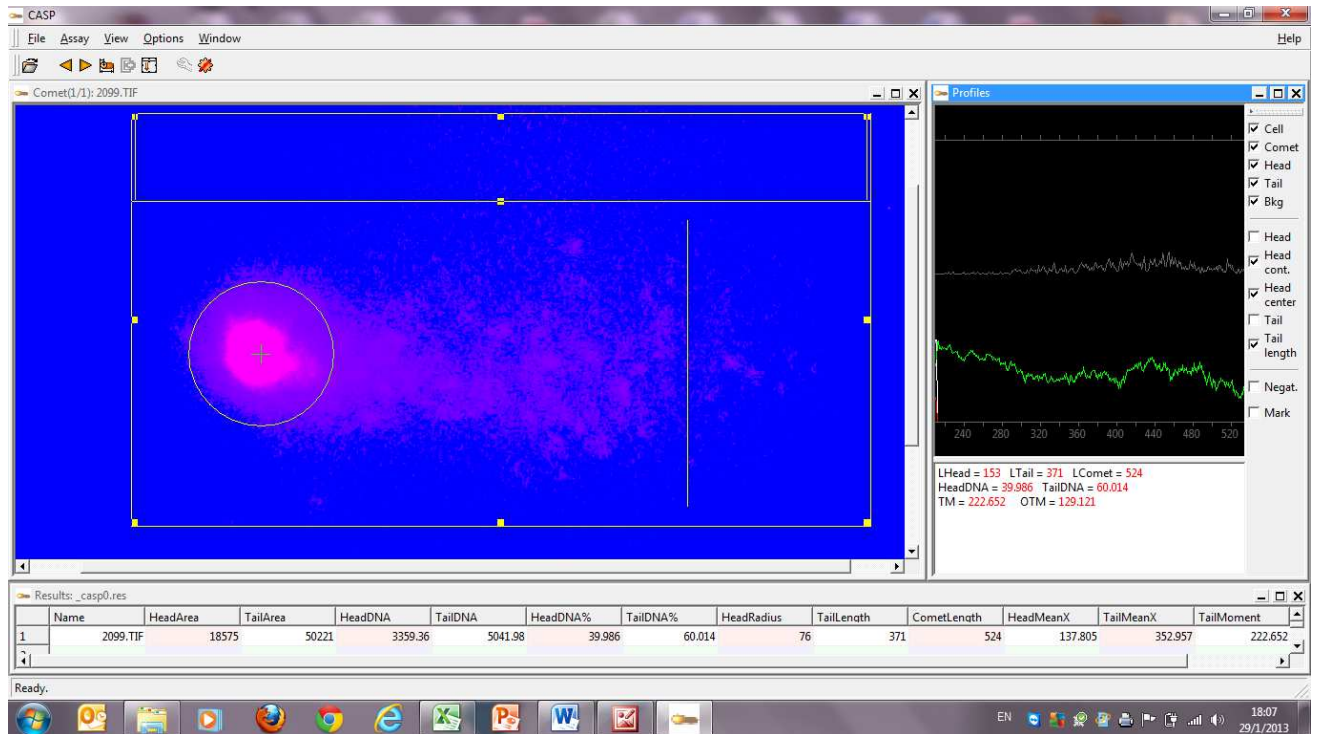
Εικόνα 16: Καταγραφή κομητών με τη βοήθεια Η/Υ.

2.4.6. Εκτίμηση της βλάβης του DNA - Υπολογισμός της παραμέτρου TM

Όπως προαναφέρθηκε η έκταση της βλάβης του DNA εκτιμάται μετρώντας τη μετατόπιση ανάμεσα στον πυρήνα του κυττάρου ή «κεφαλή του κομήτη» και την «ουρά» η οποία προκύπτει λόγω κερματισμού του πυρηνικού DNA (Εικόνα 10). Μεταξύ των παραμέτρων που χρησιμοποιούνται είναι η εκατοστιαία αναλογία του DNA στην ουρά, η εκατοστιαία αναλογία του DNA στον πυρήνα, το μήκος της ουράς, η διάμετρος του πυρήνα και το συνολικό μήκος του κομήτη (Εικ. 17). Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η παράμετρος TM - Tail Moment (το γινόμενο του μήκους της ουράς επί το ποσοστό του DNA στην ουρά του κομήτη), (Εικ. 18).



Εικόνα 17: Ηπατοκύτταρα τσιπούρας (*S. aurata*) σε πήκτωμα αγαρόζης και αλκαλικό pH μετά από χρώση βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr). Αριστερά, φαίνονται κύτταρα με ελάχιστο βαθμό κερματισμού, με αποτέλεσμα το DNA να παραμένει στον πυρήνα. Αντίθετα, στα δεξιά το κύτταρο έχει υποστεί εκτεταμένο κερματισμό, το DNA μεταναστεύει έξω από το κυτταρικό σώμα (κεφαλή του κομήτη) και μέσα στο πήκτωμα της αγαρόζης (ουρά του κομήτη).



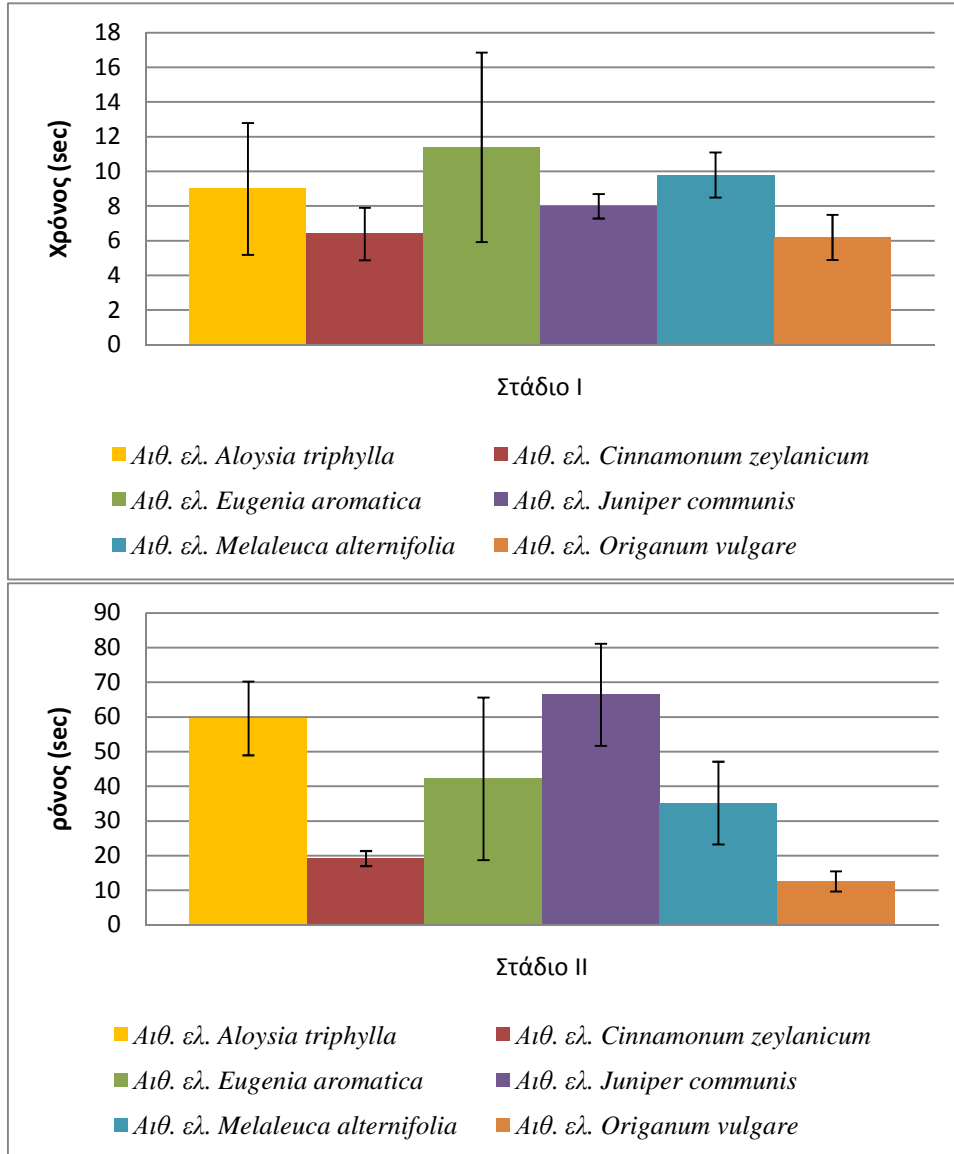
Εικόνα 18: Υπολογισμός των παραμέτρων (Name, HeadArea, TailArea, HeadDNA, TailDNA, HeadDNA%, TailDNA%, HeadRadius, TailLength, CometLength, HeadMeanX, TailMeanX, TailMoment) του κατακερματισμού του DNA, μέσω του λογισμικού ανάλυσης εικόνας "casp".

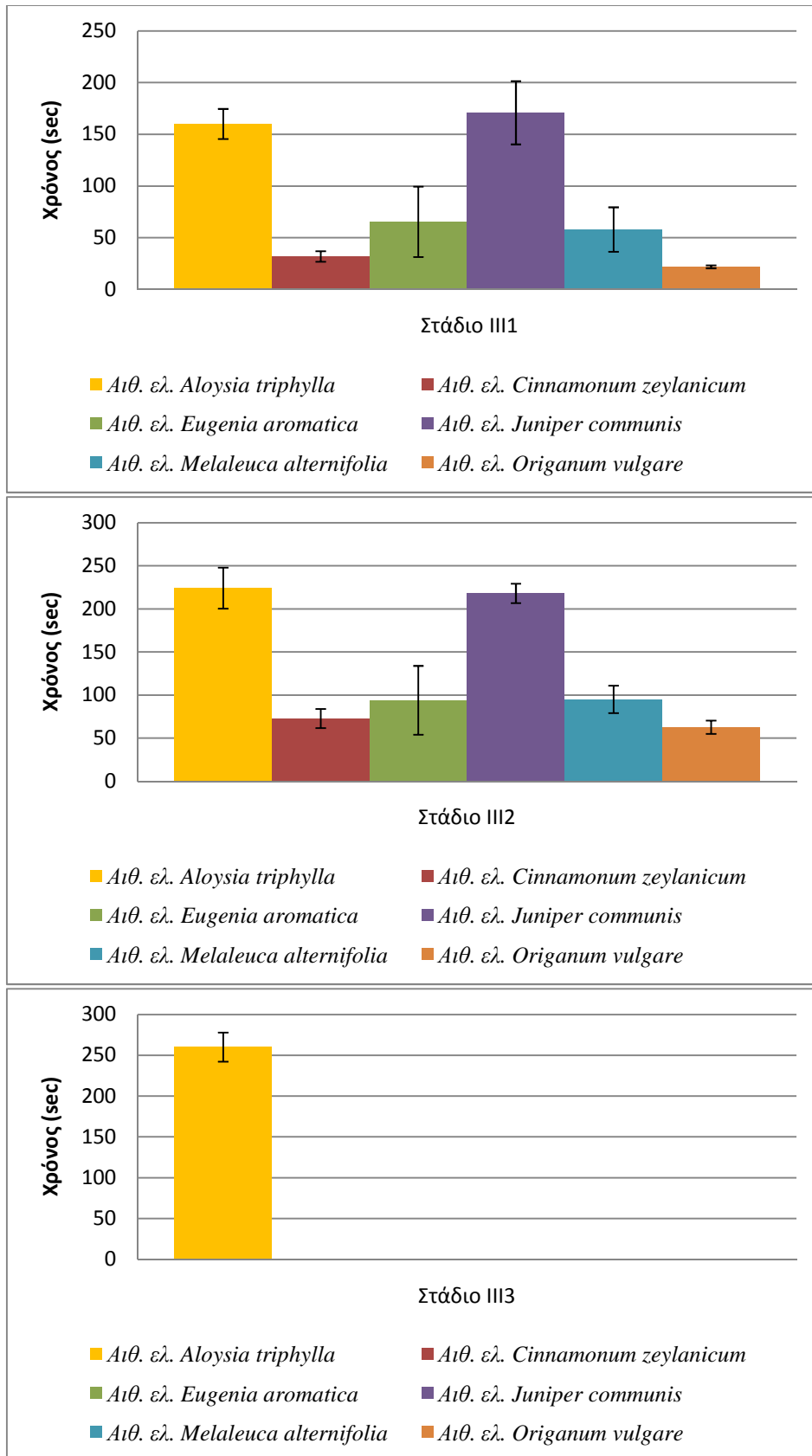
2.4.7. Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα που αφορούσαν στους χρόνους αναισθησίας, χρόνους ανάνηψης, θνησιμότητα και tail moment των κομητών επεξεργάστηκαν με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS statistics 17.0 και με το excel MS office 2010. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε $\alpha = 0,05$. Για τις πολλαπλές συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό τεστ "one way Anova" και το κριτήριο Tukey HSD. Για τον έλεγχο της ομοιογένειας των διασπορών χρησιμοποιήθηκε το κριτήριο του Levene. (Zar, 1996)

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

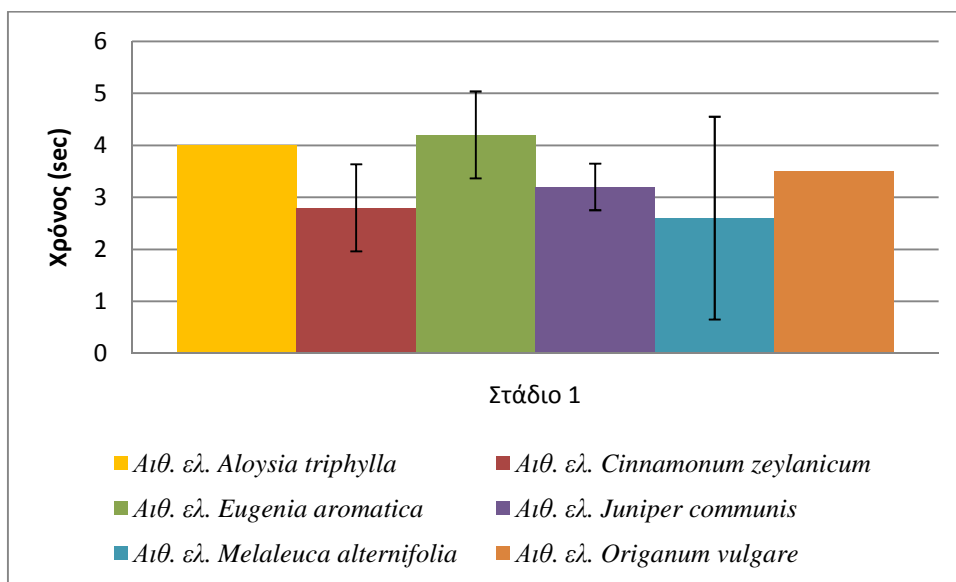
Αναισθησία για 5 min και ανάνηψη

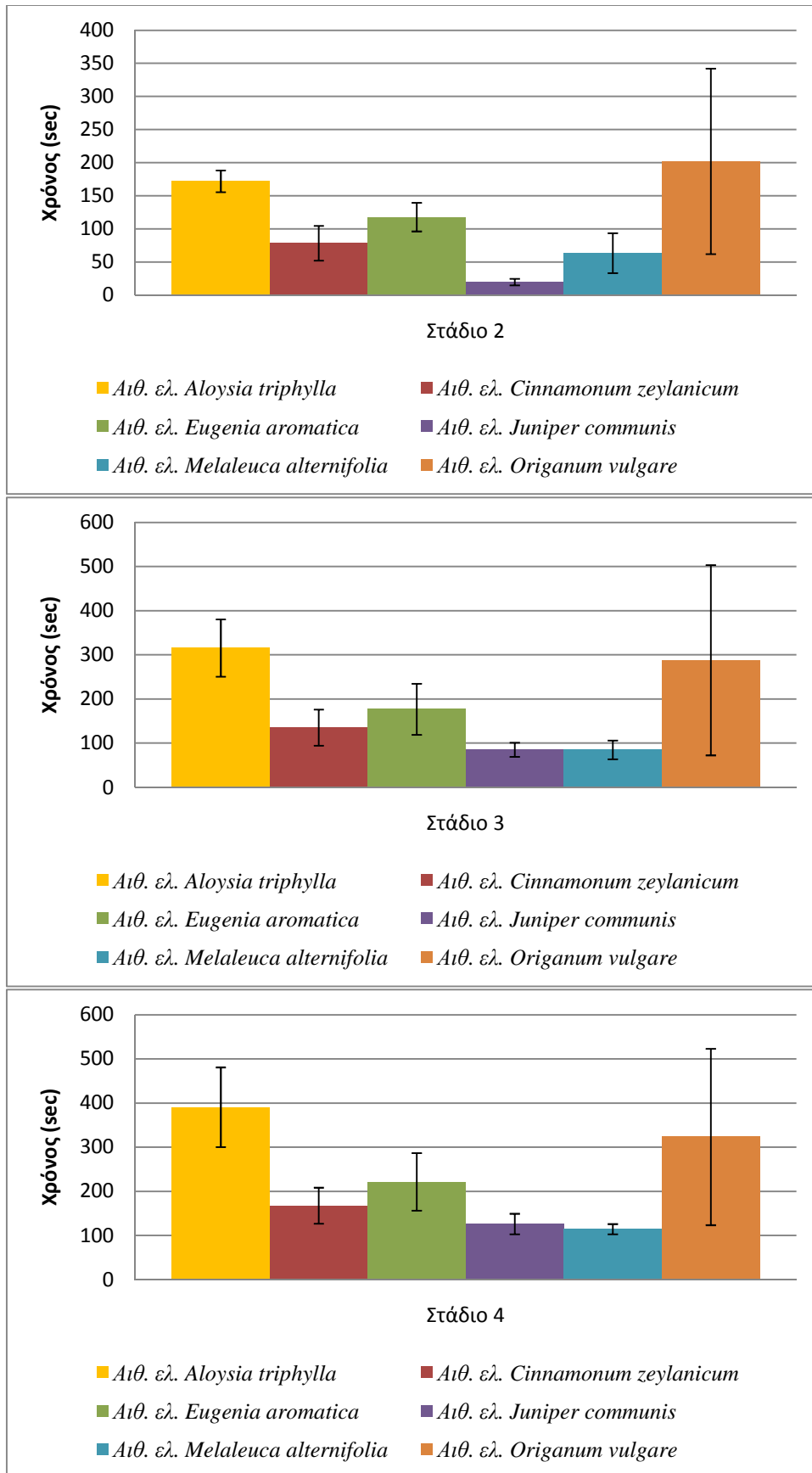


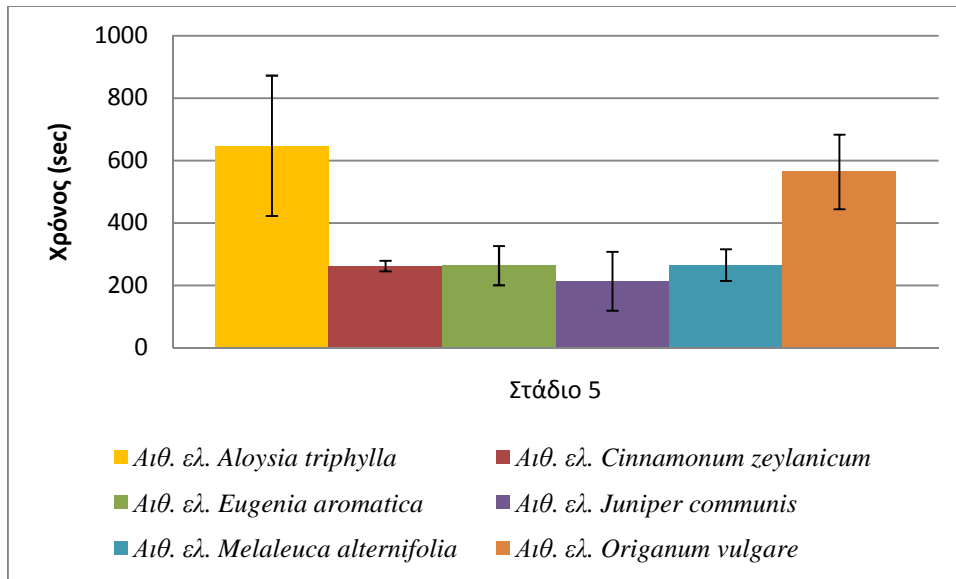


Σχήμα 1: Στάδια αναισθησίας ψαριών κατά τη διάρκεια των 5 min

Κατά την αναισθησία των 5 ψαριών για 5 min δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των αναισθητικών που δοκιμάστηκαν όταν τα ψάρια έφτασαν στο πρώτο στάδιο αναισθησίας. Στα στάδια αναισθησίας II και III1 (Σχ. 1) έφτασαν πιο γρήγορα τα ψάρια στα οποία εφαρμόστηκε το αιθέριο έλαιο ρίγανης χωρίς όμως να παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές από τα αιθέρια έλαια κανέλας και τεϊόδεντρου. Επίσης, στο στάδιο αναισθησίας III2 έφτασαν πιο γρήγορα τα ψάρια στα οποία εφαρμόστηκε αναισθησία με αιθέριο έλαιο ρίγανης αν και δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές από τα αιθέρια έλαια κανέλας, τεϊόδεντρου και γαρύφαλλου. Τα περισσότερα από τα ψάρια τα οποία εξετάστηκαν στη διάρκεια αυτού του πειράματος δεν πέρασαν στο στάδιο αναισθησίας III2 με εξαίρεση αυτά τα οποία αναισθητοποιήθηκαν με αιθέριο έλαιο λουίζας. Τέλος στο στάδιο αναισθησίας IV δεν έφτασε κανένα από τα υπό εξέταση δείγματα στη διάρκεια των 5 min που διήρκεσε το συγκεκριμένο πείραμα.



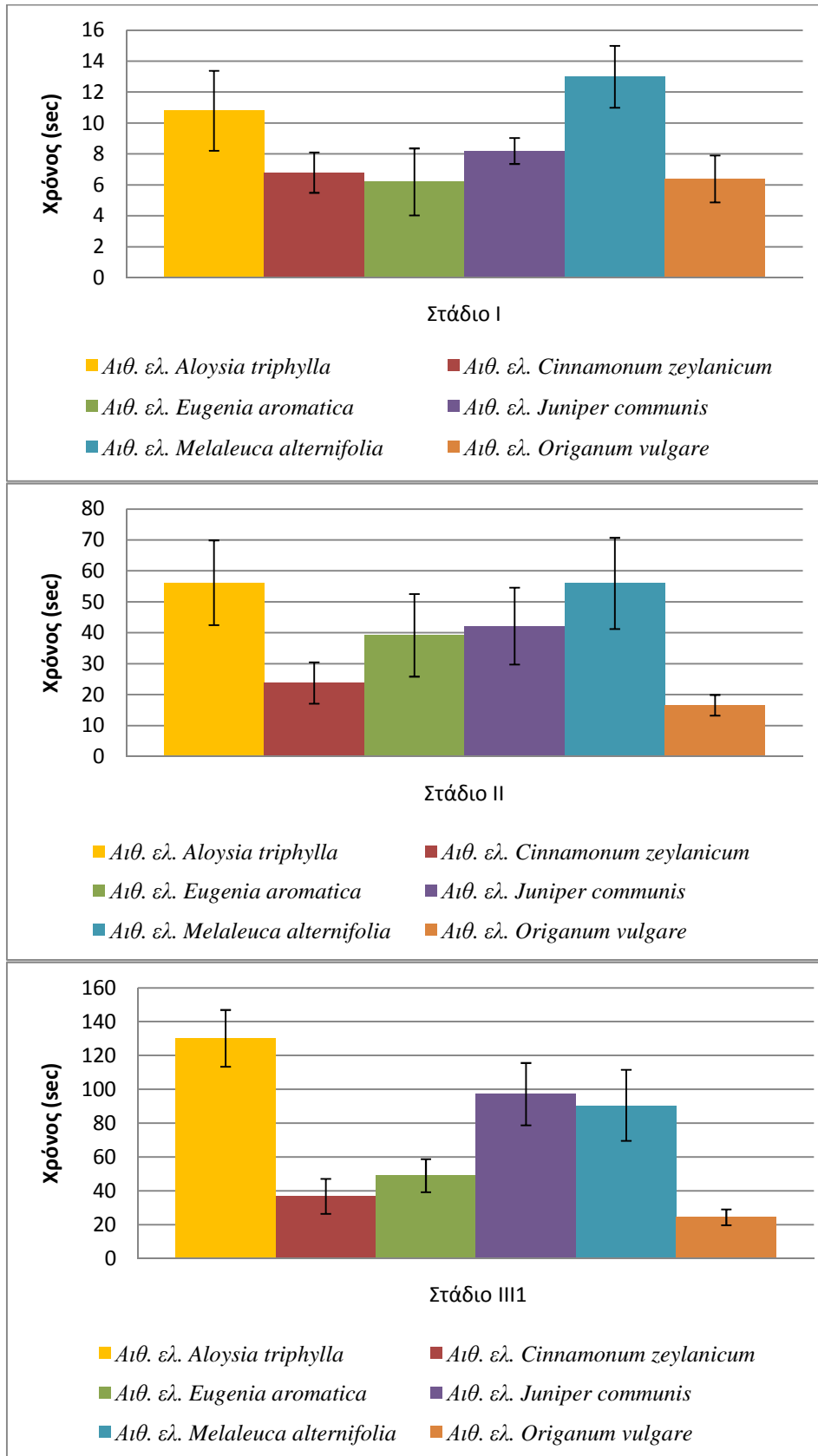


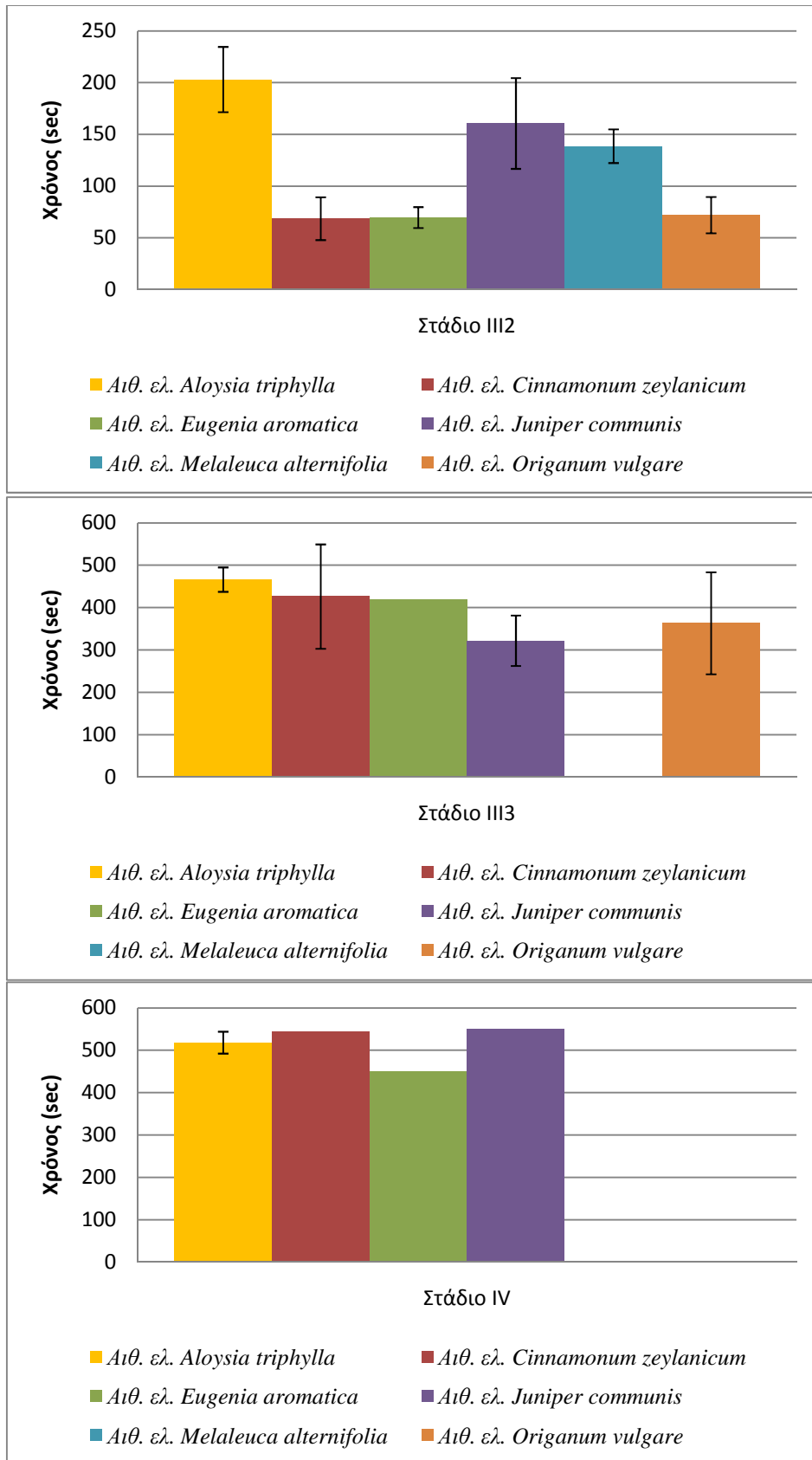


Σχήμα 2: Στάδια ανάνηψης ψαριών μετά από 5 min

Κατά την ανάνηψη, μετά από αναισθησία 5 min, όλα τα ψάρια τα οποία εξετάστηκαν έφτασαν εξίσου γρήγορα στο πρώτο στάδιο ανάνηψης, χωρίς να παρατηρούνται μεταξύ τους στατιστικά σημαντικές διαφορές. Στο δεύτερο, τρίτο, τέταρτο και πέμπτο στάδιο ανάνηψης πιο γρήγορα έφτασαν τα ψάρια τα οποία είχαν αναισθητοποιηθεί με το αιθέριο έλαιο αγριοκυπάρισσου και τειόδεντρου (Σχ. 2) χωρίς να παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές από τα αιθέρια έλαια κανέλας και γαρύφαλλου.

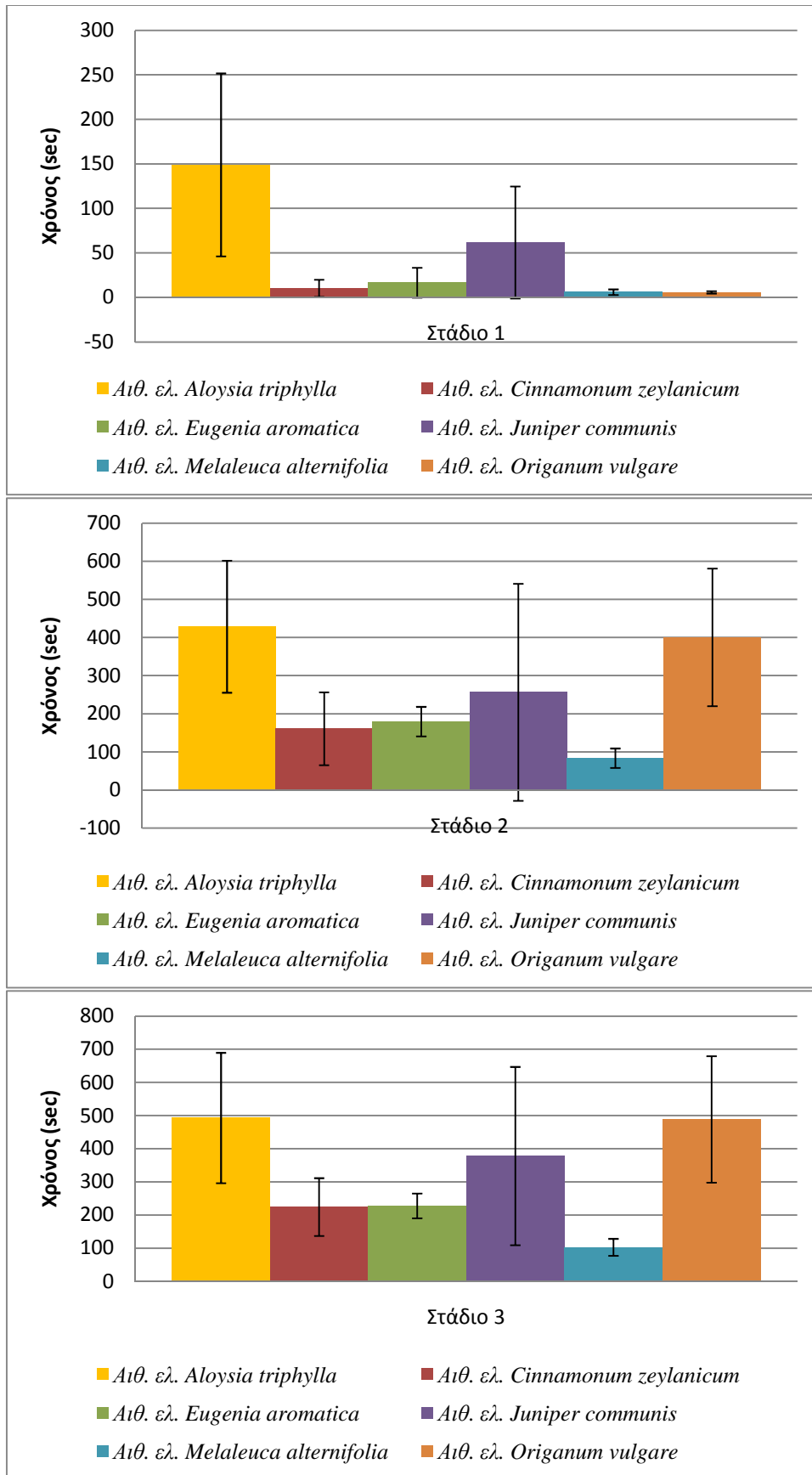
Αναισθησία για 10 min και ανάνηψη

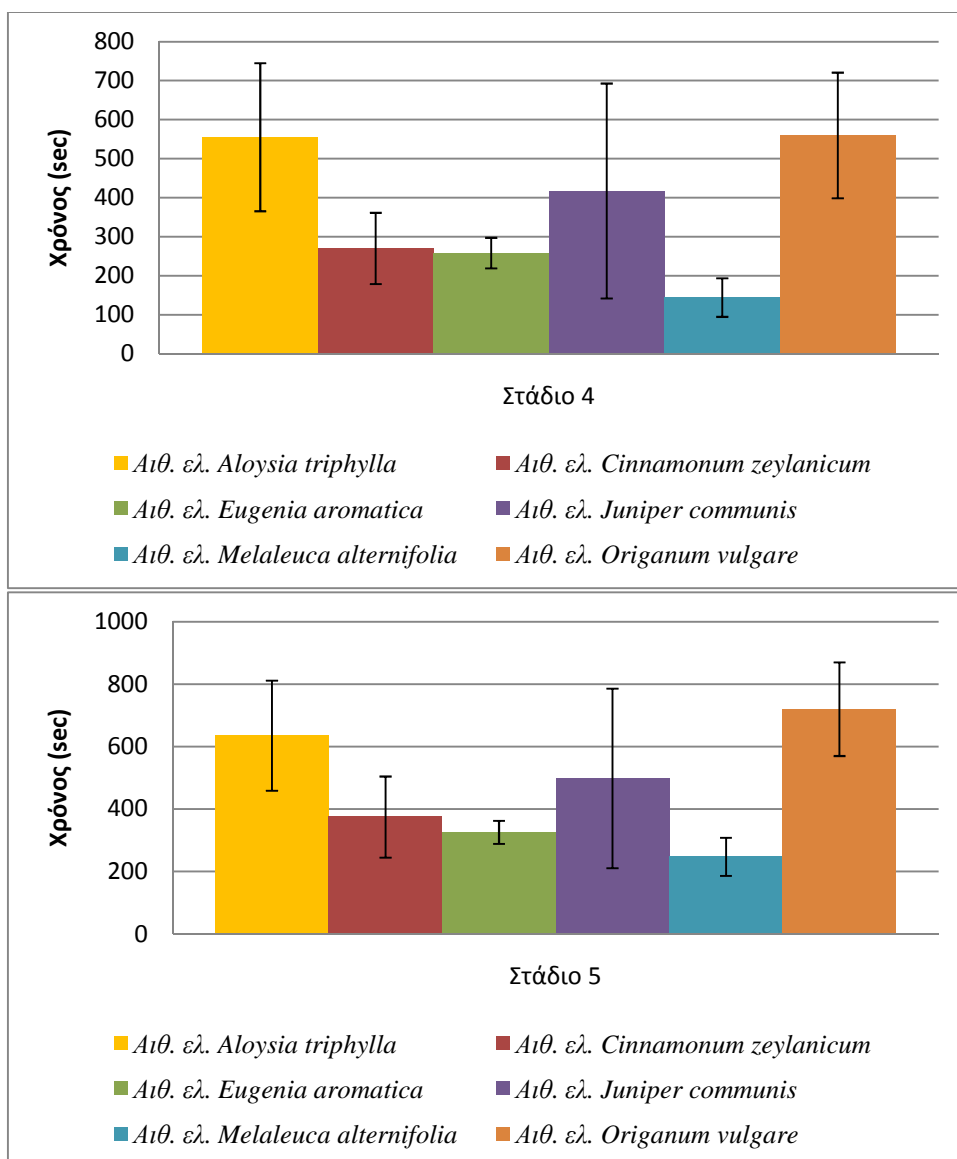




Σχήμα 3: Στάδια αναισθησίας ψαριών κατά τη διάρκεια των 10 min

Κατά την αναισθησία των 5 ψαριών για 10 min, στο στάδιο αναισθησίας I έφτασαν πιο γρήγορα τα ψάρια στα οποία εφαρμόστηκε αναισθησία με αιθέριο έλαιο ρίγανης και γαρύφαλλου (Σχ. 3) αν και δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές από τα αιθέρια έλαια κανέλας και αγριοκυπαρισσιού. Στα στάδια αναισθησίας II και III1 έφτασαν πιο γρήγορα τα ψάρια στα οποία εφαρμόστηκε το αιθέριο έλαιο ρίγανης χωρίς όμως να παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές από το αιθέριο έλαιο κανέλας. Επίσης, στο στάδιο αναισθησίας III2 έφτασαν πιο γρήγορα τα ψάρια στα οποία εφαρμόστηκε αναισθησία με αιθέριο έλαιο κανέλας αν και δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές από τα αιθέρια έλαια, ρίγανης και γαρύφαλλου. Στο στάδιο αναισθησίας III3 έφτασαν πιο γρήγορα τα ψάρια στα οποία εφαρμόστηκε αναισθησία με αιθέριο έλαιο αγριοκυπαρισσιού αν και δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές από τα αιθέρια έλαια, κανέλας και ρίγανης. Τα ψάρια τα οποία αναισθητοποιήθηκαν με αιθέριο έλαιο τειόδεντρου δεν πέρασαν στο στάδιο αναισθησίας IV. Τέλος στο στάδιο αναισθησίας V έφτασαν πιο γρήγορα τα ψάρια στα οποία εφαρμόστηκε αναισθησία με αιθέριο έλαιο γαρύφαλλου. Τα ψάρια τα οποία αναισθητοποιήθηκαν με αιθέριο έλαιο τειόδεντρου και ρίγανης δεν πέρασαν στο στάδιο αναισθησίας V στη διάρκεια των 10 min που διήρκησε το συγκεκριμένο πείραμα.



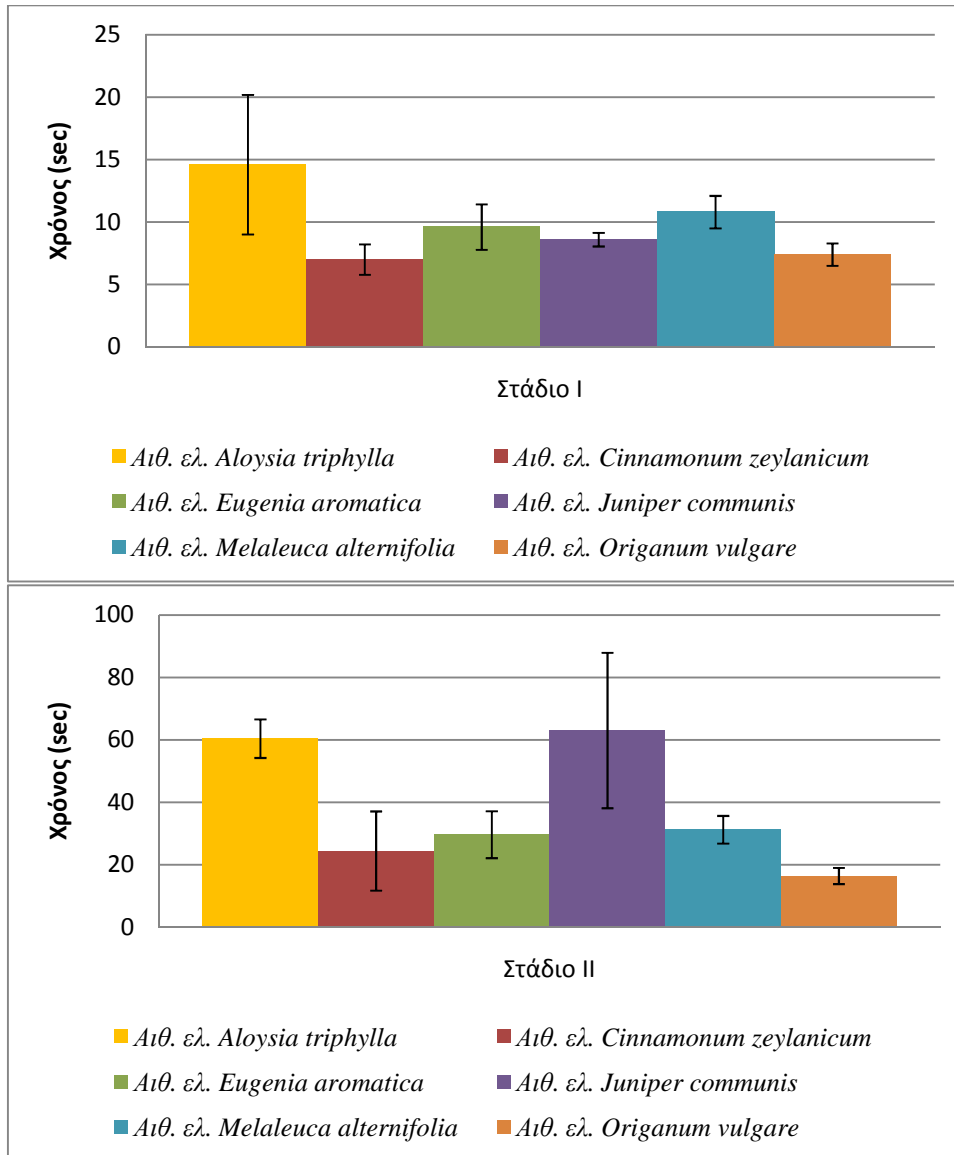


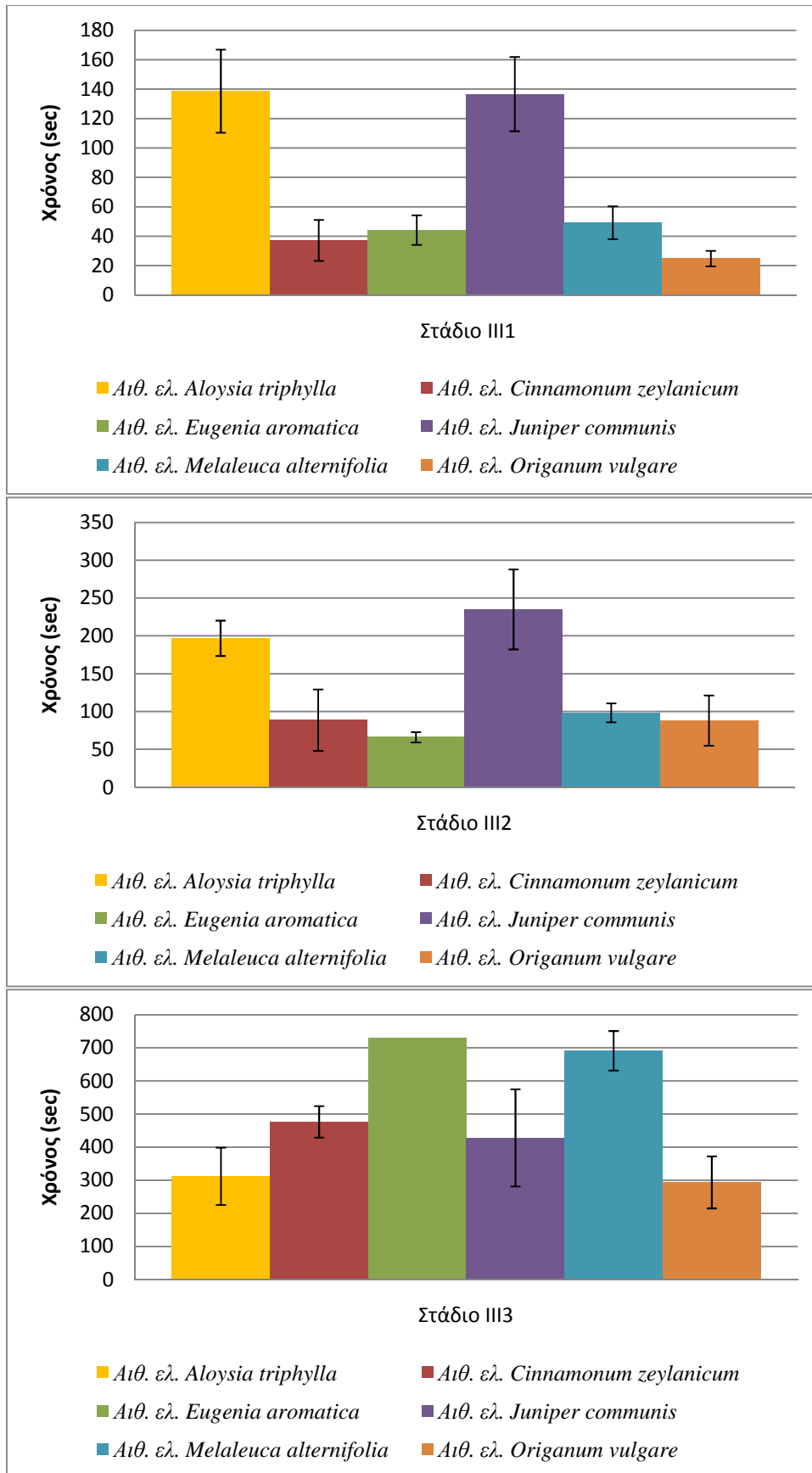
Σχήμα 4: Στάδια ανάνηψης ψαριών μετά από 10 min

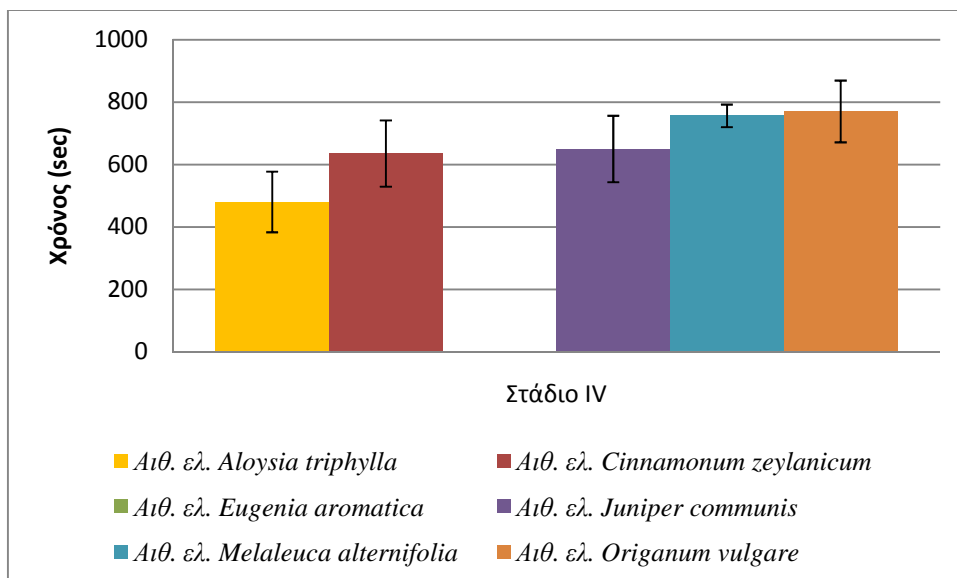
Κατά την ανάνηψη, μετά από αναισθησία 10 min, πιο γρήγορα έφτασαν τα ψάρια τα οποία είχαν αναισθητοποιηθεί με το αιθέριο έλαιο ρίγανης και τειόδεντρου (Σχ. 4) χωρίς να παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές από τα αιθέρια έλαια κανέλας, αγριοκυπαρισσιού και γαρύφαλλου. Στο δεύτερο, τρίτο, τέταρτο και πέμπτο στάδιο ανάνηψης πιο γρήγορα έφτασαν τα ψάρια τα οποία είχαν αναισθητοποιηθεί με

το αιθέριο έλαιο τειόδεντρου χωρίς να παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές από τα αιθέρια έλαια κανέλας, γαρύφαλλου και αγριοκυπαρισσιού.

Αναισθησία για 15 min και ανάνηψη



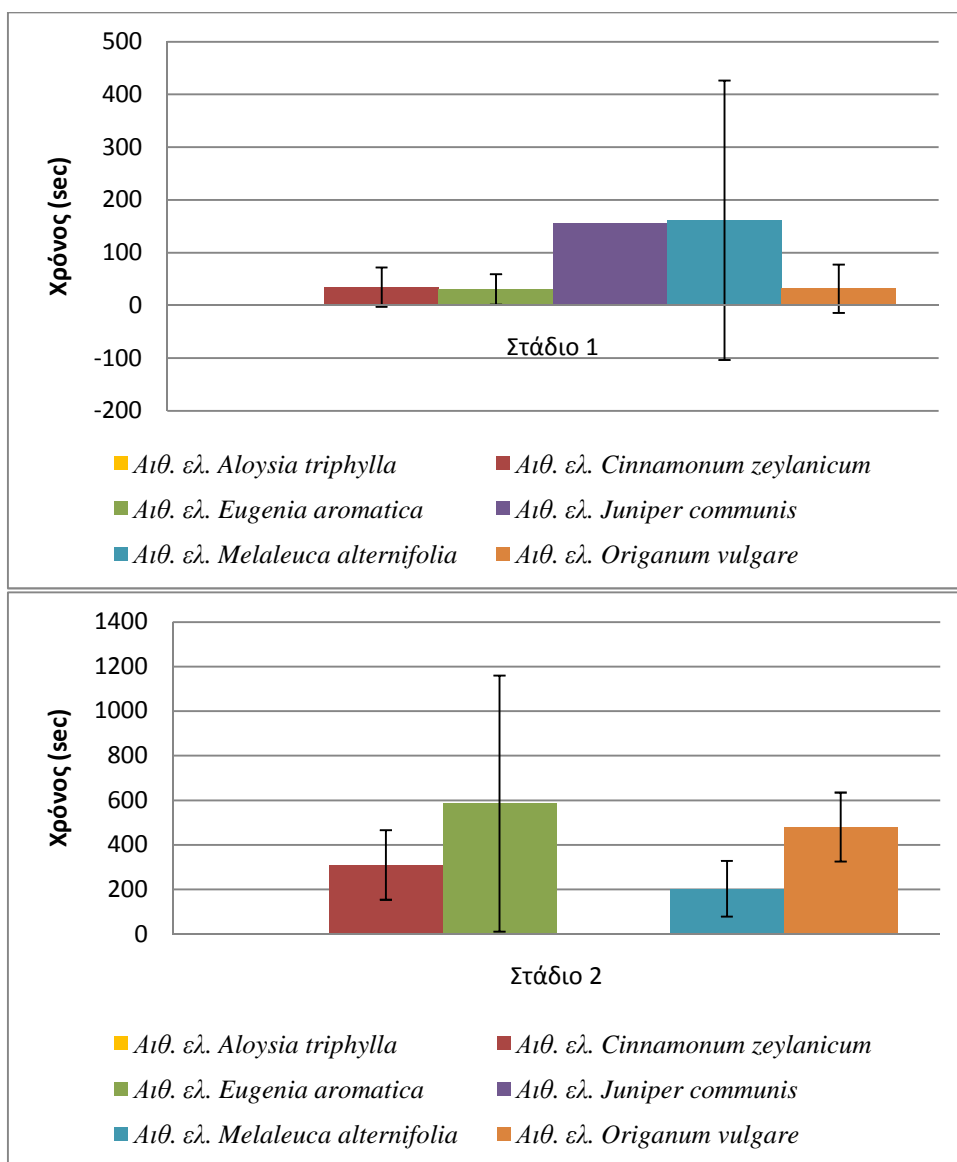


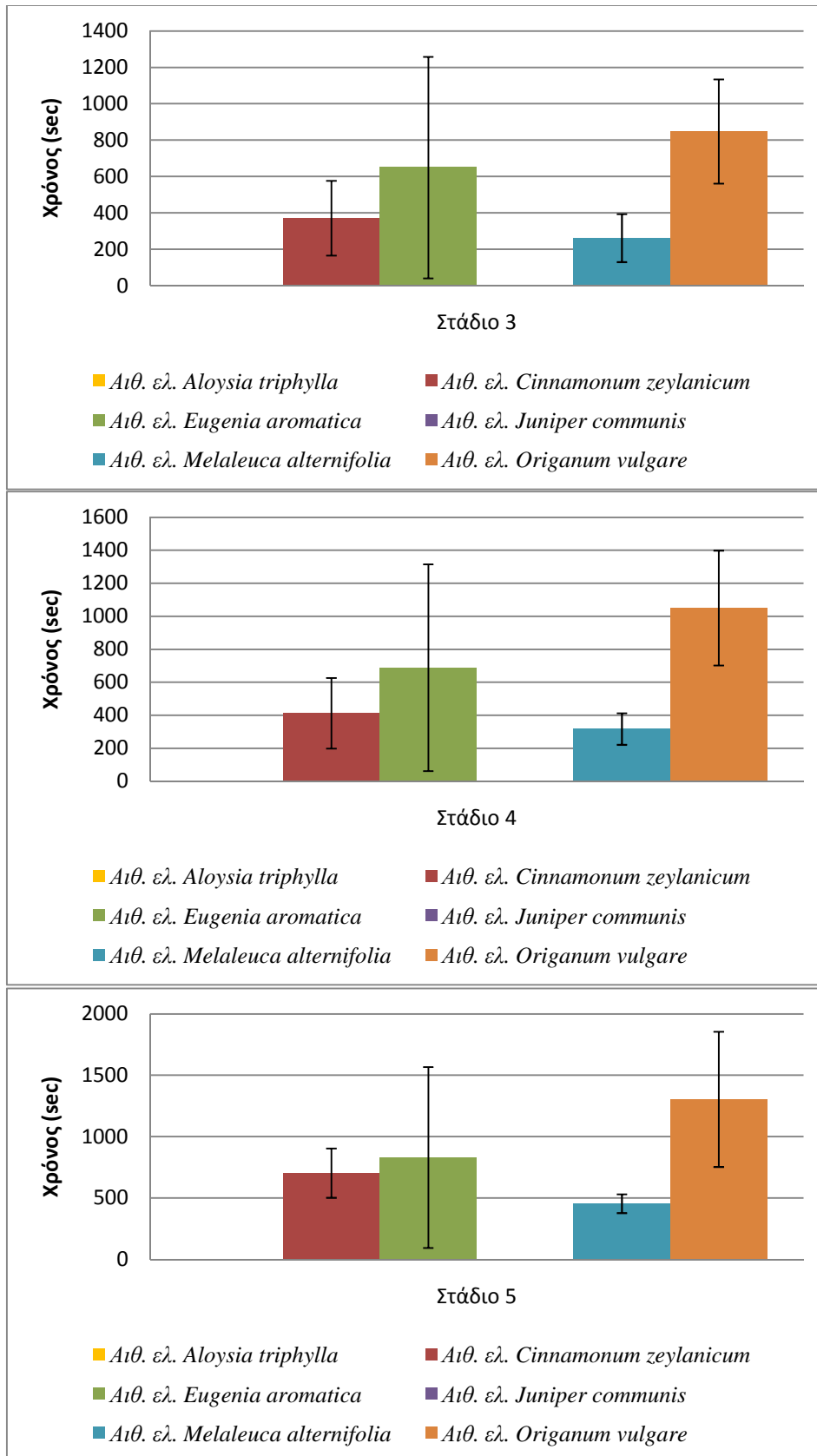


Σχήμα 5: Στάδια αναισθησίας ψαριών κατά τη διάρκεια των 15 min

Κατά την αναισθησία των 5 ψαριών για 15 min, στο στάδιο αναισθησίας I έφτασαν πιο γρήγορα τα ψάρια στα οποία εφαρμόστηκε αναισθησία με αιθέριο έλαιο ρίγανης και κανέλας (Σχ. 5) αν και δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές από τα αιθέρια έλαια αγριοκυπαρισσιού και γαρύφαλλου. Στα στάδια αναισθησίας II και III1 έφτασαν πιο γρήγορα τα ψάρια στα οποία εφαρμόστηκε το αιθέριο έλαιο ρίγανης χωρίς όμως να παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές από τα αιθέρια έλαια κανέλας, γαρύφαλλου και τειόδεντρου. Επίσης, στο στάδιο αναισθησίας III2 έφτασαν πιο γρήγορα τα ψάρια στα οποία εφαρμόστηκε αναισθησία με αιθέριο έλαιο κανέλας αν και δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές από τα αιθέρια έλαια, τειόδεντρου, ρίγανης και γαρύφαλλου. Στο στάδιο αναισθησίας III3 έφτασαν πιο γρήγορα τα ψάρια στα οποία εφαρμόστηκε το αιθέριο έλαιο ρίγανης χωρίς όμως να παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές από τα αιθέρια έλαια λουίζας και αγριοκυπαρισσιού. Τέλος στο στάδιο αναισθησίας V έφτασαν πιο γρήγορα τα ψάρια στα οποία εφαρμόστηκε αναισθησία με αιθέριο έλαιο λουίζας χωρίς όμως να

παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές από τα αιθέρια έλαια, αγριοκυπαρισσιού, τεϊόδεντρου, κανέλας και ρίγανης. Τα ψάρια τα οποία αναισθητοποιήθηκαν με αιθέριο έλαιο γαρύφαλλου δεν πέρασαν στο στάδιο αναισθησίας V στη διάρκεια των 15 min που διήρκτησε το συγκεκριμένο πείραμα.

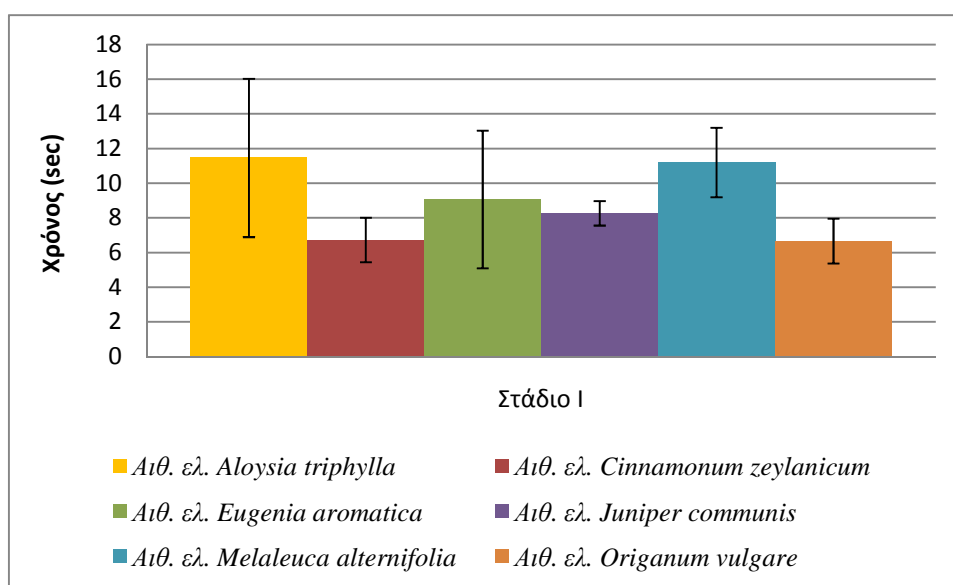


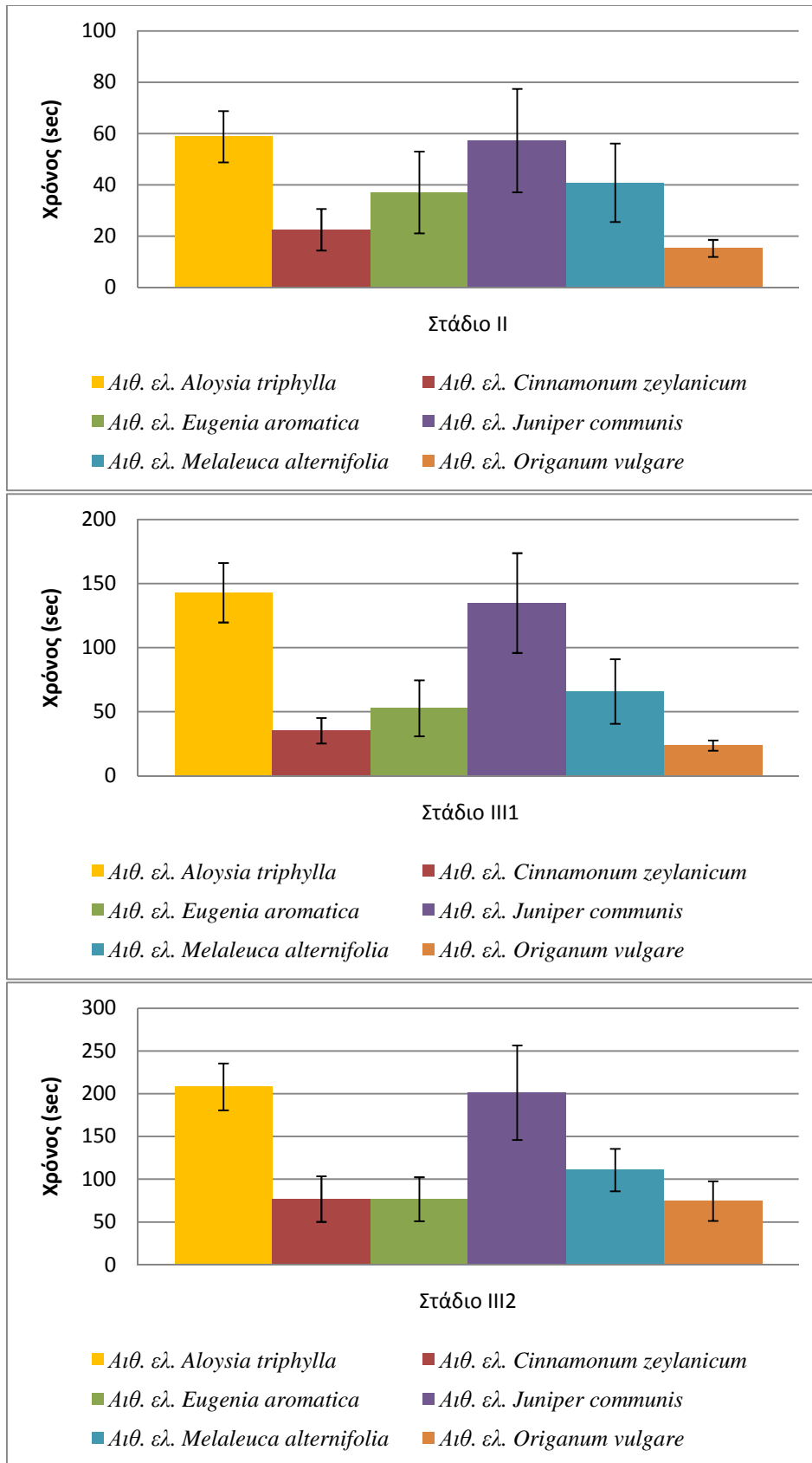


Σχήμα 6: Στάδια ανάνηψης ψαριών μετά από 15 min

Κατά την ανάνηψη, μετά από αναισθησία 15 min, τα ψάρια τα οποία είχαν αναισθητοποιηθεί με το αιθέριο έλαιο λουΐζας δεν ανάνησαν ποτέ (Σχ. 6). Στο πρώτο, στάδιο ανάνηψης πιο γρήγορα έφτασαν τα ψάρια τα οποία είχαν αναισθητοποιηθεί με το αιθέριο έλαιο κανέλας, ρίγανης και γαρύφαλλου χωρίς να παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές από το αιθέριο έλαιο τεϊόδεντρου. Στο δεύτερο, τρίτο, τέταρτο και πέμπτο στάδιο ανάνηψης, τα ψάρια τα οποία είχαν αναισθητοποιηθεί με το αιθέριο έλαιο αγριοκυπαρισσιού δεν ανάνησαν ποτέ, ενώ πιο γρήγορα έφτασαν τα ψάρια τα οποία είχαν αναισθητοποιηθεί με το αιθέριο έλαιο τεϊόδεντρου χωρίς να παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές από τα αιθέρια έλαια κανέλας, ρίγανης και γαρύφαλλου.

Αναισθησία όλων των ψαριών μέχρι το στάδιο της χειρουργικής αναισθησίας

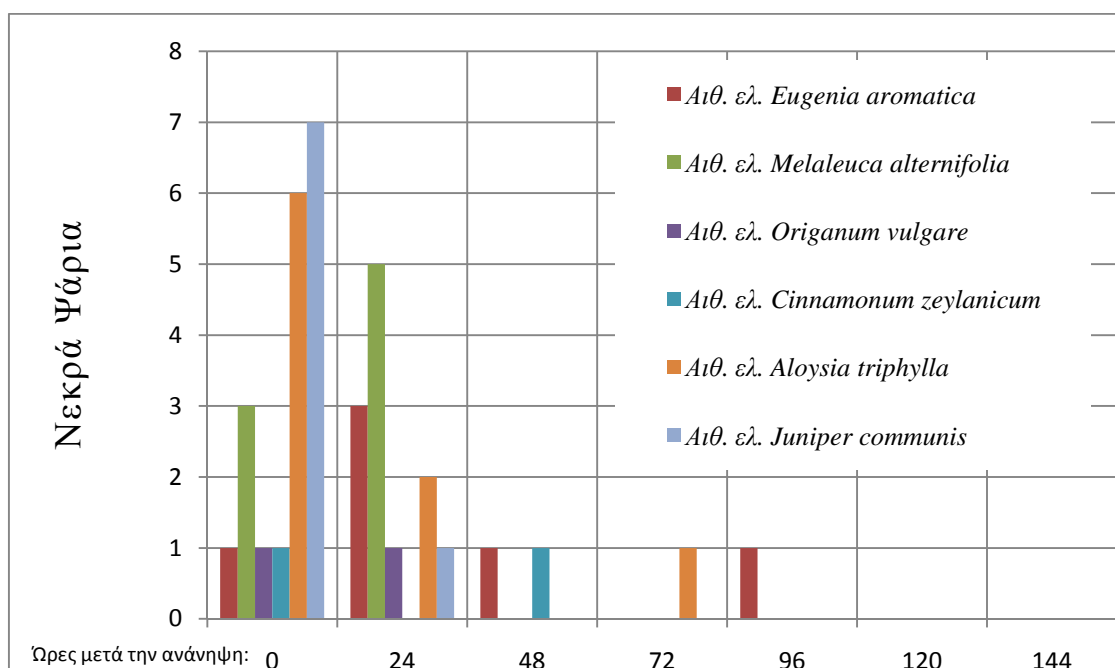




Σχήμα 7: Στάδια αναισθησίας όλων των ψαριών μέχρι το στάδιο της χειρουργικής αναισθησίας

Κατά την αναισθησία των 15 ψαριών, αυτά που έφτασαν πιο γρήγορα στα στάδια αναισθησίας I, II, III1 και III2 (Σχ. 7) ήταν αυτά στα οποία εφαρμόστηκε το αιθέριο έλαιο ρίγανης και κανέλας, χωρίς όμως να παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές από τα αιθέρια έλαια γαρύφαλλου και τεϊόδεντρου.

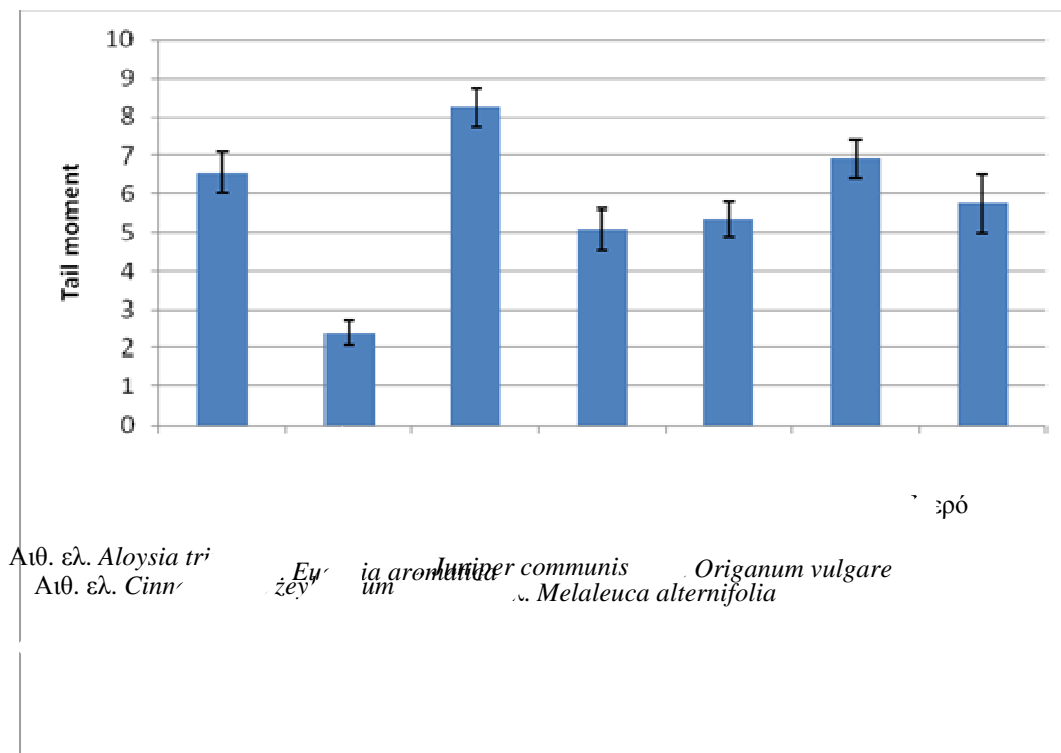
Επίδραση της αναισθησίας στη θνησιμότητα



Σχήμα 8: Θνησιμότητα

Από το γράφημα προέκυψε ότι οι λιγότερες θνησιμότητες παρατηρήθηκαν στην περίπτωση που η αναισθησία έγινε με τα αιθέρια έλαια κανέλας και ρίγανης (Σχ. 8), ενώ οι περισσότερες παρατηρήθηκαν στην περίπτωση που εφαρμόστηκε το αιθέριο έλαιο λουίζας. Επίσης προέκυψε ότι οι περισσότερες θνησιμότητες παρατηρούνται στις 24 πρώτες ώρες.

Καταπόνηση των ψαριών από τη χρήση αναισθητικών



Σχήμα 9: Tail moment (Δηλαδή το γινόμενο του μήκους της ουράς επί το ποσοστό του DNA στην ουρά του κομήτη - Παράμετρος εκτίμησης της βλάβης του DNA-)

Μετά από ανάλυση των κομητών προέκυψε ότι η αναισθησία με αιθέριο έλαιο κανέλας προκαλεί στατιστικά σημαντικά μικρότερη καταπόνηση (Σχ. 9) σε σχέση με τα υπόλοιπα έλαια που εξετάστηκαν. Αντιθέτως το αιθέριο έλαιο γαρύφαλλου προκαλεί την μεγαλύτερη καταπόνηση ($p < 0,05$).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η αναισθησία χρησιμοποιείται για την προσωρινή μείωση ή αφαίρεση της αίσθησης, έτσι ώστε να μπορούν να πραγματοποιηθούν επώδυνες διαδικασίες ή χειρουργικές επεμβάσεις. Είναι ουσιαστικά μια αναστρέψιμη κατάσταση που μπορεί να ανακουφίσει τον πόνο, να μειώσει το άγχος και να παραλύσει τους μυς (Freeman,

2000). Ο χειρισμός των υδρόβιων ζώων μέσα και έξω από το φυσικό τους περιβάλλον σχεδόν πάντα περιλαμβάνει σωματική δραστηριότητα του ψαριού. Ο χαρακτηριστικός τους αγώνας κατά τη διάρκεια της αιχμαλωσίας και του χειρισμού επηρεάζει και τη συμπεριφορά τους και κατά συνέπεια είναι συχνά απαραίτητο να ακινητοποιηθεί το ψάρι πριν γίνει ακόμη και η πιο απλή εργασία. Τα αναισθητικά περιορίζουν το στρες και εξασφαλίζουν την ευζωία στα υπό μελέτη ζώα (Ashley, 2006). Σύμφωνα με τους Marking και Meyer, 1985, τα χαρακτηριστικά του ιδανικού αναισθητικού είναι: χρόνος δράσης μικρότερος των 5 min και προτιμότερο λιγότερο των 3 min, χρόνος ανάνηψης μικρός (5 min ή λιγότερο), μη τοξικό για τα ψάρια, εύκολο στο χειρισμό και ασφαλές για το χειριστή, χωρίς μόνιμες επιπτώσεις στη φυσιολογία και συμπεριφορά του ψαριού, να απεκκρίνεται ή μεταβολίζεται γρήγορα χωρίς να αφήνει κατάλοιπα, να μην έχει συσσωρευτικές επιπτώσεις ή προβλήματα από την επανειλημμένη έκθεση σ' αυτό και να έχει χαμηλό κόστος.

Μέχρι σήμερα στους χειρισμούς των εκτρεφόμενων υδρόβιων οργανισμών χρησιμοποιούνται κυρίως συνθετικές χημικές αναισθητικές ουσίες (da Cunha 2010) ενώ από τα φυσικά αναισθητικά που χρησιμοποιούνται στην υδρόβια ζωή, ιδιαίτερης μνείας χρήζει το γαρυφαλέλαιο, για το οποίο έχουν εκπονηθεί οι περισσότερες μελέτες.

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή έγινε διερεύνηση της επίδρασης έξι αναισθητικών φυσικής προέλευσης αφ' ενός μέσα από τους χρόνους που διαγράφονται στα στάδια αναισθησίας και ανάνηψης και αφετέρου από το μέγεθος της βλάβης που υφίσταται το DNA του ψαριού, μέσω της οποίας μπορεί να προσδιοριστεί η καταπόνησης εξαιτίας της αναισθησίας.

Κατά τη μελέτη της συμπεριφοράς των ψαριών κατά την αναισθησία και ανάνηψη και τη χρονομέτρηση των σταδίων, παρατηρήθηκαν για κάθε ουσία κάποια

ποιοτικά χαρακτηριστικά. Το χαρακτηριστικό του αιθέριου ελαίου του φυτού *Juniperus communis* (άρκευθος ή αγριοκυπαρίσσι) συγκέντρωσης 900 $\mu\text{L/L}$ είναι ότι αναισθητοποιείται το ψάρι, φτάνοντας στο στάδιο της χειρουργικής αναισθησίας σε $201,3 \pm 55,28$ sec, πολλές φορές όμως δημιουργεί σ' αυτό περιοδικούς σπασμούς που διαρκούν σχεδόν μέχρι το θάνατό του. Επίσης τα ψάρια έχουν μεγάλο ποσοστό θνησιμότητας, που για παραμονή στο αναισθητικό για 15 min αγγίζει το 100%.

Το χαρακτηριστικό του αιθέριου ελαίου του φυτού *Aloysia triphylla*, (λουίζα) συγκέντρωσης 200 $\mu\text{L/L}$, είναι ότι αναισθητοποιείται το ψάρι, φτάνοντας στο στάδιο της χειρουργικής αναισθησίας σε $208 \pm 27,31$ sec, πολλές φορές όμως από τη στιγμή που χάνεται ο μυϊκός τόνος μένει για πολύ λίγο χρόνο στη ζωή. Επίσης και σ' αυτό το αναισθητικό τα ψάρια έχουν μεγάλο ποσοστό θνησιμότητας, που για παραμονή μέσα σ' αυτό για 15 min η θνησιμότητα αγγίζει το 100%.

Για το αιθέριο έλαιο του φυτού *Melaleuca alternifolia* (τεϊόδεντρο – tea tree oil) συγκέντρωσης 200 $\mu\text{L/L}$, οι χρόνοι αναισθησίας και ανάνηψης ήταν μέτριοι σε σχέση με τα άλλα φυσικά αναισθητικά. Ο χρόνος για το στάδιο της χειρουργικής αναισθησίας ήταν $111 \pm 24,75$ sec και ο χρόνος ανάνηψης $302 \pm 103,83$ sec και τα ψάρια είχαν ένα σημαντικό ποσοστό θνησιμότητας.

Στο αιθέριο έλαιο του φυτού *Origanum vulgare* (ρίγανη) 50 $\mu\text{L/L}$, τα ψάρια ενώ αναισθητοποιήθηκαν σε ικανοποιητικά μικρό χρόνο - φτάνουν στο στάδιο της χειρουργικής αναισθησίας σε $74 \pm 23,21$ sec - άργησαν να ανανήψουν ($871 \pm 403,48$ sec).

Την πιο ομαλή συμπεριφορά στην αναισθησία παρουσίασε το αιθέριο έλαιο του φυτού *Cinnamomum zeylanicum* (κανέλα) συγκέντρωσης 40 $\mu\text{L/L}$ με χρόνο έως το στο στάδιο της χειρουργικής αναισθησίας $77 \pm 26,67$ sec και χρόνος ανάνηψης $429 \pm 222,94$ sec) και το αιθέριο έλαιο του φυτού *Eugenia aromaticum* (γαρυφαλέλαιο)

συγκέντρωσης 40 $\mu\text{L/L}$ με χρόνο έως το στο στάδιο της χειρουργικής αναισθησίας $77 \pm 25,72 \text{ sec}$ και χρόνο ανάνηψης $484 \pm 491,10 \text{ sec}$.

Από άποψη βιβλιογραφικών αναφορών υπάρχουν πολλές για το γαρυφαλέλαιο και ελάχιστες έως καθόλου για τα υπόλοιπα φυσικά αναισθητικά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή. Για το γαρυφαλέλαιο οι βιβλιογραφικές αναφορές συμφωνούν με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας. Έτσι αναφέρεται ότι το γαρυφαλέλαιο είναι φτηνό, αποτελεσματικό και σε συγκέντρωση 30-40 mg/L είναι ιδανικό για αναισθησία του ψαριού *Puntius denisonii* (Day, 1865) με χρόνο αναισθησίας $< 3 \text{ min}$. (Sajan 2012). Αναφέρεται επίσης ότι η ισοευγενόλη (συστατικό του γαρυφαλέλαιου) φάνηκε να έχει ευρύ περιθώριο ασφάλειας με προβλέψιμα αποτελέσματα που εξαρτώνται από τη δόση. Συγκεντρώσεις των 40-80 mg/L προκάλεσαν αναισθησία μέσα σε 4 έως 11 min και ήταν σημαντικά μικρότερες από ότι συγκέντρωση που σχετίζεται με το θάνατο του ψαριού (Gladden *et al.* 2010).

Όσον αφορά στην επίδραση της αναισθησίας των ψαριών στην καταπόνηση όπως αυτή καταγράφεται με τη μέθοδο COMET, τη μικρότερη βλάβη στο DNA άρα και μικρότερο καταπόνηση υπέστησαν τα ψάρια που είχαν αναισθητοποιηθεί με το αιθέριο έλαιο του φυτού *Cinnamomum zeylanicum* (κανέλα) συγκέντρωσης 50 $\mu\text{L/L}$. Σύμφωνα με τη υπάρχουσα βιβλιογραφία για τη μέθοδο COMET αναφέρεται ότι τα αναισθητικά MS222 (tricaine) και benzocaine δεν επιφέρουν βλάβη στο DNA (Barreto *et al.* 2007, De Miranda Cabral Gontijo *et al.* 2003) όπως επίσης και για το γαρυφαλέλαιο (Χασάν Ε. και συν., 2011)

Από τις συγκρίσεις μεταξύ φυσικών και χημικών αναισθητικών φαίνεται σε πολλές περιπτώσεις ότι υπερτερούν τα φυσικά (Kristan, 2012). Έτσι έχει παρατηρηθεί

ότι το γαρυφαλέλαιο έχει μικρότερους χρόνους αναισθησίας και ανάνηψης συγκριτικά με τη 2-φαινοξυαιθανόλη σε μικρότερες δόσεις (Μυλωνάς και συν 2005).

Επίσης τα φυσικά αναισθητικά υπερτερούν και ως προς την επίδραση στην ποιότητα της σάρκας του ψαριού, είναι φτηνότερα και δεν επιβαρύνουν το περιβάλλον (Cho, G.K. et.al. 2000, Iversen M. 2003). Έτσι στο ευρωπαϊκό λαβράκι *Dicentrarchus labrax*, (Linnaeus 1758) η αναισθησία με γαρυφαλέλαιο, έχει βρεθεί ότι βελτιώνει την ποιότητα της σάρκας και την ευζωία του λαβρακιού σε σχέση με τη 2-φαινοξυαιθανόλη Simitzis et al. (2013). Σύμφωνα με τους Di Marco et.al. (2011) η αναισθησία με MS 222 (tricaine methanesulphonate) είχε μεγαλύτερες επιπτώσεις και παρενέργειες στη φυσιολογία του υβριδίου οξύρρυγχου συγκρινόμενο με το γαρυφαλέλαιο, πράγμα που δείχνει ότι η χρήση του γαρυφαλέλαιου ήταν καλύτερη από το MS 222 στη μείωση του στρες. Επίσης κατά την αναισθησία με MS 222 ή με 2-phenoxyethanol σε τσιπούρες (*Sparus aurata*), βρέθηκε ότι η έκθεση στα παραπάνω αναισθητικά προκαλεί αντίδραση στρες στην τσιπούρα η οποία συνεχίζεται έως 24 ώρες από το χρόνο αποκατάστασης (Molinero, 1995).

Επίσης, τα φυσικά αναισθητικά δεν προκαλούν ανοσοκαταστολή σε σχέση με τα χημικά (Bressler 2004), ενώ δρουν και σαν αντιοξειδωτικά των λιπιδίων Veeck, A.P.L. et al. (2013). Επίσης τα αναισθητικά MS222, benzocaine, 2-phenoxyethanol και quinaldine sulphate δοκιμάστηκαν για να παρατηρηθούν οι επιδράσεις τους στο ανοσοποιητικό σύστημα της τσιπούρας (*Sparus aurata*). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα τέσσερα αναισθητικά παρήγαγαν αυξημένα επίπεδα γλυκόζης μετά από μία ώρα. Επιπροσθέτως, η benzocaine και η 2-phenoxyethanol κατέστειλαν συμπληρωματική δραστηριότητα και φαγοκυττάρωση (Ortuño et al. 2002).

Τα μειονεκτήματα των χημικών αναισθητικών απορρέουν και από το γεγονός ότι αρκετές μελέτες δείχνουν πως για να βελτιωθούν οι αναισθητικές ιδιότητές τους πρέπει να δράσουν αυτά συνδυαστικά και με άλλες ουσίες. Έτσι για να ενισχυθεί η αναισθησία των χημικών αναισθητικών, να εξαλειφθούν οι ανεπιθύμητες δράσεις και να μειωθεί η έξαψη και η υπερκινητικότητα των ψαριών σε περιορισμένο χώρο, χωρίς να οδηγήσει σε θνησιμότητα μπορεί να χορηγηθούν μαζί με τα χημικά αναισθητικά και άλλες ουσίες (Kumlu, et al. 1999, Huang, *et al.* 2010, Park, et al. (2004).

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Όλα τα αιθέρια έλαια που χρησιμοποιήθηκαν έδρασαν αναισθητικά στα ψάρια. Την καλύτερη συμπεριφορά την έχει το αιθέριο έλαιο του φυτού *Cinnamomum zeylanicum* (κανέλα) συγκέντρωσης 40 $\mu\text{L/L}$. Ο μέσος χρόνος αναισθησίας για το στάδιο της χειρουργικής αναισθησίας είναι $77 \pm 26,67 \text{ sec}$ δηλαδή ($1,28 \pm 0,44 \text{ min}$) και ο μέσος χρόνος ανάνηψης είναι $429 \pm 222,94 \text{ sec}$ δηλαδή ($7,14 \pm 3,72 \text{ min}$). Όσον αφορά την καταπόνηση που καθορίζεται από το ποσοστό κατακερμάτωσης του DNA, το αιθέριο έλαιο του φυτού *Cinnamomum zeylanicum* (κανέλα) συγκέντρωσης 40 $\mu\text{L/L}$ είναι το μόνο που δημιουργεί στα ψάρια τη μικρότερη καταπόνηση και σε σχέση με τα υπόλοιπα αναισθητικά που εξετάστηκαν. Ως εκ τούτου το αιθέριο έλαιο του φυτού *Cinnamomum zeylanicum* (κανέλα) συγκέντρωσης 40 $\mu\text{L/L}$ είναι το πιο αποτελεσματικό από τα έξι φυσικά αναισθητικά που εφαρμόστηκαν, επιδεικνύοντας πολύ καλές επιδόσεις στους τομείς που εξετάστηκαν, προκαλώντας αναισθησία και ανάνηψη σε σύντομο χρονικό διάστημα και προκαλώντας μικρή καταπόνηση.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

6.1. Ξένη

- Afkhami, M., Ahmadi, M.R., Salarzadeh, A., Ehsanpour, M. (2013). Comparative efficacy of two anesthetic agents in the Sobaity sea bream, *Sparidentex hasta* (Valenciennes 1830) Comparative Clinical Pathology , pp. 1-6
- Akbulut, B., Aydin, I., Çavdar, Y. (2012). Influence of temperature on clove oil anaesthesia in flounder (*Platichthys flesus* Linnaeus, 1758). Journal of Applied Ichthyology 28:2, 254-257
- Anderson, W.G., Mckinley, R.S., Colavecchia, M. (1997). The use of clove oil as an anesthetic for rainbow trout and its effects on swimming performance. North American Journal of Fisheries Management 17:2, 301-307
- Ashley, P.J. (2006). Fish welfare: Current issues in aquaculture. Applied Animal Behaviour Science, doi:10.1016
- Baksi S. M., Frazier J. M. (1990). Isolated hepatocytes-model systems for toxicology research. Aquatic Toxicology, 16:229-259.
- Baksi S.M. and Frazier J.M. (1990). Review. Isolated fish hepatocytes- model system for toxicology research. Aquatic Toxicology, 16:229-256.
- Barreto R. E., A. M. M. C. Gontijo, R. O. Alves-de-Lima, V. C. Raymundi, D. Pinhal, V. A. V. Reyes, G. L. Volpato, D. M. F. Salvadori MS222 does not induce primary DNA damage in fish Aquaculture International April 2007, Volume 15, Issue 2, pp 163-168.

Barnabe G. (1990). Rearing bass and gilthead sea bream. In: Aquaculture vol. 2., Ellis Horwood, London: 647-686

Bauchot M.I., Hureau J.C. (1986). Sparidae. In: Fishes of North- eastern Atlantic and Mediterranean. Whitehead, P.J., M.I. Bauchot, J.C. Hureau, J. Nielsen and E. Tortonese, UNESCO United Kingdom:883- 907.

Breber P., Strada R. M. (1995). Research for bioindicators as quality criteria for lagoons. Biol. Mar. Mediterr., 2:119-120.

Bressler, K., Ron, B. (2004). Effect of anesthetics on stress and the innate immune system of gilthead seabream (*Sparus aurata*)

Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh 56 (1) , pp. 5-13

Chaieb, K., Hajlaoui, H., Zmantar, t., Kahla-Nakbi, A.B., Rouabhia, M., Mahdouani, K., Bakhrouf, A. (2007). The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzigium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. Phytotherapy Research, 21:6, 501-506

Chavanne H., Chatain B., Haffary P. and Batargias K. (2008). Review on breeding and reproduction of European aquaculture species. Gilthead Seabream (*Sparus aurata* L.). Aqua Breeding

Collins, A. R., Duthie, S. J., and Dobson, V. I. (1993). Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA Carcinogenesis 14:1733-1735.

Coyle, S.D., Durborow, R.M. and Tidwell, J.H. (2004). Anesthetics in Aquaculture.

Southern Regional Aquaculture Center (SRAC Publication No. 3900)

da Cunha, M.A., Barros, F.M.C., Garcia, L.O., Veeck, A.P.L., Heinzmann, B.M., Loro, V.L., Emanuelli, T., Baldisserotto, B. (2010). Essential oil of *Lippia alba*: a new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*, *Aquaculture* 306:403-406

da Cunha, M.A., Zeppenfeld, C.C., Garcia, L.O., Loro, V.L., da Fonseca, M.B., Emanuelli, T., Veeck, A.P.L., (...), Baldisserotto, B. (2010). Anesthesia of silver catfish with eugenol: Time of induction, cortisol response and sensory analysis of fillet [Anestesia de jundiás com eugenol: Tempo de indução, resposta ao cortisol e análise sensorial do file] *Ciencia Rural* 40:10, 2107-2114

De Miranda Cabral Gontijo, A.M., Barreto, R.E., Speit, G., Valenzuela Reyes, V.A., Volpato, G.L., Favero Salvadori, D.M. Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results 2003. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 534 (1-2) , pp. 165-172

Dennog, C., Hartmann, A., Frey, G., and Speit, G. (1996). Detection of DNA damage after hyperbaric oxygen (HBO) therapy. *Mutagenesis* 11: 605-609.

Devaux A., Pesonens M. and Monod G. (1997). Alkaline comet assay in rainbow trout hepatocytes. *Toxicology in Vitro*, 11 :71-79.

Di Marco, P., Petochi, T., Longobardi, A., Priori, A., Finoia, M.G., Donadelli, V., Corsalini, I., Marino, G. Efficacy of tricaine methanesulphonate, clove oil and medetomidine-ketamine and their side effects on the physiology of sturgeon hybrid

Acipenser naccarii×*Acipenser baerii* (2011) *Journal of Applied Ichthyology* 27 (2) , pp. 611-617

Doleželová, P., Mácová, S., Plhalová, L., Pištěková, V., Svobodová, Z. (2011). The acute toxicity of clove oil to fish *Danio rerio* and *Poecilia reticulata*. *Acta Veterinaria Brno* 80:3, 305-308

Filiciotto, F., Buscaino, G., Buffa, G., Bellante, A., Maccarrone, V., Mazzola, S. (2012). Anaesthetic qualities of eugenol and 2-phenoxyethanol and their effect on same haematological parameters hi farmed European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Journal of Animal and Veterinary Advances* 11:4, 494-502

Fishbein, M. (1976). *Anesthesia. The New Illustrated Medical and Health Encyclopedia*. New York: H. S. Stuttman Co. pp. 87–9

Freeman, S. (2000). *How Anesthesia Works*, available online at <http://www.science.howstuffworks.com/anesthesia.htm> (πρόσβαση 15/6/2012)

Fusco, J. C., Afshari, A. J., George, M. H., et al. (1996). *Ιn vivo* genotoxicity of dichloroacetic acid: evaluation with the mouse peripheral blood micronucleus assay and the single cell gel assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 27:1-9.

Gladden, J.N., Brainard, B.M., Shelton, J.L., Camus, A.C., Divers, S.J. (2010). Evaluation of isoeugenol for anesthesia in koi carp (*Cyprinus carpio*) *American Journal of Veterinary Research* 71 (8) ,pp. 859-866

Gordon J. (2002) *Fish and Amphibian Anesthesia*. 2012. Cornell University Institutional Animal Care and Use Committee, available online at

<http://www.research.cornell.edu/care/documents/ACUPs/ACUP110.pdf> (πρόσβαση 15/6/2012)

Hartmann, A., Herkommer, K., Glóck, M., and Speit, G. (1995). The DNA-damaging effect of cyclophosphamide on human blood cells *in vivo* and *in vitro* studied with the single cell gel test (SCG). *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 25: 180-187.

Hoseini, S.M., Nodeh, A.J. (2011). Changes in blood biochemistry of common carp *Cyprinus carpio* (Linnaeus), following exposure to different concentrations of clove solution. *Comparative Clinical Pathology* , pp. 1-5 Article in Press

Hoseini, S.M., Hosseini, S.A., Nodeh, A.J. (2011). Serum biochemical characteristics of Beluga, *Huso huso* (L.), in response to blood sampling after clove powder solution exposure. *Fish Physiology and Biochemistry* 37:3, 567-572

Huang, W.-C., Hsieh, Y.-S., Chen, I.-H., Wang, C.-H., Chang, H.-W., Yang, C.-C., Ku, T.-H., (...), Chuang, Y.-J. (2010). Combined use of MS-222 (Tricaine) and isoflurane extends anesthesia time and minimizes cardiac rhythm side effects in adult zebrafish. *Zebrafish* 7 (3) , pp. 297-304

Inger Hilde Zahl (2012), Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare. Ole Samuelsen and Anders Kiessling *Fish Physiology and Biochemistry*, Volume 38, Number 1, Pages 201-218

Inoue, L.A.K.A., Boijink, C.L., Ribeiro, P.T., da Silva, A.M.D., Affonso, E.G. (2011). Evaluation of tambaqui metabolic responses to eugenol in anesthetics baths | [avaliação de respostas metabólicas do tambaqui exposto ao eugenol em banhos anestésicos *Acta Amazonica* 41:2, 327-332

Iversen, M.H., Økland, F., Thorstad, E.B., Finstad, B. (2012). The efficacy of Aqui-S vet. (iso-eugenol) and metomidate as anaesthetics in European eel (*Anguilla anguilla* L.), and their effects on animal welfare and primary and secondary stress responses.

Aquaculture Research, Article in Press

Javahery, S., Moradlu, A.H., Ghorbani, R. (2012). Efficacy of clove oil as an anaesthetic for two sizes of *Rutilus frisii kutum* Global Veterinaria 9 (3) , pp. 319-322

Keene J L , Noakes D L G , Moccia R D , Soto C G. (1998) The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquaculture Research Volume 29, Issue 2, pages 89–101, February 1998

Końca, K., Lankoff, A., Banasik, A., Lisowska, H., Kuszewski, T., Gózdź, S., Koza, Z., Wojcik, A. A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay (2003). Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 534 (1-2) , pp. 15-20

Kristan, J., Stara, A., Turek, J., Policar, T., Velisek, J. (2012). Comparison of the effects of four anaesthetics on haematological and blood biochemical profiles in pikeperch (*Sander lucioperca* L.) Neuroendocrinology Letters 33 (SUPPL. 3) , pp. 66-71

Kumlu, M., Yanar, M. (1999). Effects of the anesthetic quinaldine sulphate and muscle relaxant diazepam on sea bream juveniles (*Sparus Aurata*). Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh 51 (4) , pp. 143-147

Marking, L.L., Meyer, F.P. (1985). (Are Better Anesthetics Needed in Fisheries? Fisheries, 10: 6

McKelvey-Martin V.J., Green M.H.I., Schmezer P., Pool-Zobel B.I., De Meo M.P. and Collins A. (1993). The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mutation Research*, 288 :47- 63.

Martin, C.-A., Teai, T., Egretaud, C., Lecchini, D., Le Pennec, M. (2011). In vitro anesthetics effects of the savage basil (*Ocimum gratissimum*) essential oil on the fish *Stegastes nigricans*.

Merk, o. and Speit, G. (1998). Significance of formaldehyde-induced DNA-protein crosslinks for mutagenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 32:260-268.

Mitchell, M.A. (2009). Anesthetic Considerations for Amphibians. *Journal of Exotic Pet Medicine* 18:1, 40-49

Mitchelmore CL, Chipman JK. (1998). ONA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutation Research*, 399: 135-147.

Molinero, A., Gonzalez, J. (1995). Comparative effects of MS 222 and 2-phenoxyethanol on gilthead sea beam (*Sparus aurata* L.) during confinement. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Physiology* 111 (3) , pp. 405-414

Munday, P.L., Wilson, S.K. (1997). Comparative efficacy of clove oil and other chemicals in anaesthetization of *Pomacentrus amboicensis*, a coral reef fish. *Journal of Fish Biology*, 51:5, 931-938.

Mylonas, C.C., Cardinaletti, G., Sigelaki, I., Polzonetti-Magni, A. (2005). Comparative efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as anesthetics in the aquaculture of

European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures. *Aquaculture*, 246:1-4, 467-481

Oliveira, J.R., do Carmo, J.L., Cavalcanti Oliveira, K.K., do Carmo Figueredo Soares, M. (2009). Sodium chloride, benzocaine and clove oil in tilapia transport water | [Cloreto de sódio, benzocaína e óleo de cravo-da-índia na água de transporte de tilápia-do-nilo]. *Revista Brasileira de Zootecnia* 38:7, 1163-1169

Olszowska, O. and Furmanowa, M. (1993). *X Coluria geoides* Ledeb.: Micropropagation, Root Culture, and the Production of Eugenol. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 24:132-147

Ortuño, J., Esteban, M.A., Meseguer, J. (2002). Effects of four anaesthetics on the innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) *Fish and Shellfish Immunology* 12 (1) , pp. 49-59

5.Park, I.-S., Hur, J.W., Song, Y.-C., Im, J.H., Johnson, S.C. (2004). Anaesthetic effect of lidocaine, hydrochloride-sodium bicarbonate on the winter flounder, *Pleuronectes americanus*. *Ocean and Polar Research* 26 (3) , pp. 475-480

Peng, Y., Wu, Y., Li, X., Li, Q., Liu, Z., Jiang, B., Liu, Y., (...), Zhang, Y. (2011). Experimental study on anesthetic effects of eugenol on *Carassius auratus* ICEOE 2011 - 2011 International Conference on Electronics and Optoelectronics, Proceedings 1 , art. no. 6013116 , pp. V1343-V1346

Pfuhler, S. and Wolf, H. U. (1996). Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline comet assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 27: 196-201.

- Prioreschi, P. (2003). Medieval anesthesia – the spongia somnifera Medical Hypotheses, 61:2, 213-219
- Ramoutsaki, I.A., Askitopoulou, H., Konsolaki, E. (2002). Pain relief and sedation in Roman Byzantine texts: Mandragoras officinarum, Hyoscyamos niger and Atropa belladonna. International Congress Series, 1242:43-50
- Rapp, A., Bock, C., Dittmar, H., and Greulich, K. O. (2000). UV-A breakage sensitivity of human chromosomes as measured by COMET- FISH depends on gene density and not on the chromosome size. Journal of Photochemistry and Photobiology, 56:109-117.
- Renault, S., Daverat, F., Pierron, F., Gonzalez, P., Dufour, S., Lanceleur, L., Schäfer, J., Baudrimont, M. (2011). The use of Eugenol and electro-narcosis as anaesthetics: Transcriptional impacts on the European eel (*Anguilla anguilla* L.). Ecotoxicology and Environmental Safety 74:6, 1573-1577
- Sajan, S., Malika, V., Anna Mercy, T.V. (2012) Use of an eco-friendly anaesthetic in the handling of *Puntius denisonii* (Day, 1865)- An endemic ornamental barb of the Western Ghats of India Indian Journal of Fisheries 59 (3) , pp. 131-135
- Santos, S. J., Singh, N. P., and Natarajan, A. T. (1997). Fluorescence *in situ* hybridization with comets. Experimental Cell Research, 232:407- 411.
- Sauvaigo, S., Serres, C., Signorini, N., Emonet, N., Richard, M. J., and Cadet, J. (1998). Use of the single cell gel electrophoresis assay for the immunofluorescent detection of specific DNA damage. Analytical Biochemistry, 259:1-7.
- Simitzis, P.E., Tsopeidakis, A., Charismiadou, M.A., Batzina, A., Deligeorgis, S.G., Miliou, H. (2013) Comparison of the effects of six stunning/killing procedures on flesh

quality of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus 1758) and evaluation of clove oil anaesthesia followed by chilling on ice/water slurry for potential implementation in aquaculture. *Aquaculture Research*.

Speit, G. and Hartmann, A. (1995). The contribution of excision repair to the DNA-effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). *Mutagenesis* 10:555-559.

Tice, R. R. (2000). The single cell gel/comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells, in *Environmental Mutagenesis* (Phillips, D. H. and Venitt, S., eds.), BIOS Scientific Publishers, Oxford: 315-339.

Tubbs, S.R., Riech, S., Verma, K., Chern, J., Mortazavi, M., Cohen-Gadol, A.A. (2011). China's first surgeon: Hua Tuo (c. 108-208 AD). *Child's Nervous System* 27:9, 1357-1360

Veeck, A.P.L., Klein, B., Ferreira, L.F., Becker, A.G., Heldwein, C.G., Heinzmann, B.M., Baldisserotto, B., Emanuelli, T. (2013). Lipid stability during the frozen storage of fillets from silver catfish exposed in vivo to the essential oil of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93 (4) , pp. 955-960

Prioreschi, P. (2003). Medieval anesthesia – the *spongia somnifera* Medical Hypotheses, 61:2, 213-219

Ramoutsaki, I.A., Askitopoulou, H., Konsolaki, E. (2002). Pain relief and sedation in Roman Byzantine texts: *Mandragoras officinarum*, *Hyoscyamos niger* and *Atropa belladonna*. *International Congress Series*, 1242:43-50

Zar, J., H. (1996). *Biostatistical analysis*. 2nd Edition. Prentice Hall, New Jersey, USA.

6.2. Ελληνική

Μυρωνίδου-Τζουβελέκη, Μ., Καλούσης, Κ., Χριστοπούλου-Αλετρά, Ε. (2009). Η Αναλγητική Αγωγή από την Ομηρική στην Ιπποκρατική Ιατρική. *Archives of Hellenic Medicine*, 26:124-129

Τσαντήλας Η. , Γαλάτος Α.Δ., Αθανασοπούλου Φ. (2005). Χρήση αναισθητικών ουσιών σε ψάρια ιχθυοκαλλιέργειών. *Δεριοδικό Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρίας*, 56:130-137.

Χασάν Ε., Μαλανδράκης Μ., Μαρτσικάλης Π., Γκολομάζου Ε., Εξαδάκτυλος Α., Νεοφύτου Χ., Παναγιωτάκη Π. (2011) Επίδραση της αναισθησίας στην καταπόνηση της τσιπούρας (*Sparus aurata* L. 1758). Πρακτικά 3^{ου} Διεθνούς Συνεδρίου Υδροβιολογίας – Αλιείας. Βόλος.

6.3. Ηλεκτρονική

McKinsey & Company Η Ελλάδα 10 Χρόνια Μπροστά: Προσδιορίζοντας το νέο Εθνικό Μοντέλο Ανάπτυξης – Σύνοψη 2011

http://www.google.gr/url?sa=t&rct=j&q=www.sev.org.gr%2F...%2Fgreece_10_years_ahead_executive_summary_g...&source=web&cd=1&sqi=2&ved=0CCoQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.sev.org.gr%2FUploads%2Fpdf%2FGreece_10_Years_Ahead_Executive_summary_Greek_version_small.pdf&ei=LJcDUdGXLKaN4gSJ94DYAQ&usg=AFQjCNFXPBo1xh4FyYCz6LIFyQnDB9C3Bw

7. ABSTRACT

Anesthesia is applied in medicine for the temporary reduction or removal of sensation, in painful surgical procedures. It's essentially a reversible condition caused by substances with anesthetic properties and can relieve pain, reduce stress and paralyze muscles.

In the past, beside pharmaceutical anesthesia, other methods such as hypnosis and ice have been applied. In current practice of anesthesia, these methods are rarely or not at all used.

Handling of aquatic animals in and out of their natural environment almost always involves stress. Stress during capture and handling affects also the behavior of fish and therefore it is often necessary to immobilize them before even the simplest procedure, e.g. blood sampling. Anesthetics reduce stress and ensure welfare for the animals used in research. The choice of anesthetic generally depends on the availability, cost, ease of use, nature of the study and the safety of the operator. It is necessary to take into consideration biological and environmental factors when comparing studies concerning anesthetics.

Biological factors include the type, stage of life cycle and the age, size and weight, lipid content, physical condition and health of the animal. All these factors influence the metabolism and therefore the effectiveness of the anesthetic. Other factors are environmental ones, such as temperature and pH.

The aim of this thesis was to investigate the performance of natural anesthetics through the stages of anesthesia and resuscitation as well as by the amount of damage inflicted on the DNA of the fish, using the molecular technique Comet Assay.

For the purpose of the experiment bream (*Sparus aurata*) was selected because it is one of the most commercially farmed species in Europe. In Greece there is a steady increase in aquaculture production with a large proportion (approximately 80%) and a significant share of exports to the European market (2.8%). Nearly 90% of the European production focuses on the Mediterranean sea bream and sea bass, 50% of which comes from Greece. A total of 114 sea breams were used from closed circuit of tanks, with weight ranging from 8,816 - 24,951 g, with mean value 15,843 g and length ranging from 8,6 - 14,0 cm with mean value 10,5 cm. The conditions during the experiment were as follows: stocking density 1 Kgr/m³, temperature 21^o C, pH 7,4, concentration of ammonia 0,5 - 2 ppm, salinity 34, dissolved oxygen 5 - 7 mg / L.

The most known substances of plant origin that have been studied for their impact as anesthetics in aquatic organisms were investigated. The following essential oils have been tested in order to determine the optimal dose for each: Essential oil of the plant *Aloysia triphylla*, (verbena), essential oil of the plant *Eugenia aromatica* (clove), essential oil of the plant *Origanum vulgare* (oregano), essential oil of the plant *Melaleuca alternifolia* (tea tree - tea tree oil), essential oil of the plant *Juniperus communis* (juniper), essential oil of the plant *Cinnamomum zeylanicum* (cinnamon). Five sea bream were used per anesthetic and for 5, 10, and 15 minutes under each anesthetic respectively. Duration of the stages of anesthesia and recovery were recorded respectively. Finally, with the application of the molecular method “Comet Assay” or single cell gel electrophoresis – (SCGE) which detected fragmented hepatocellular DNA of bream, the stress levels were determined. Therefore, the part of hepatocytes directly isolated were examined for assessment of genotoxicity (ex vivo assessment). The images were recorded by high resolution camera and projected on a screen H/Y PC

via software ProgRes Capture Pro 2.1, while the processing and analysis of the "comet" was the operational program CASP 1.0.1. Finally, all the results concerning duration of anesthesia and recovery, as well as mortality and tail moment of comets were processed with the statistical program SPSS statistics 17.0 and excel MS office 2010.

According to the results, all anesthetics exhibited genotoxicity but in different percentages. The lowest percentage occurred in the case of the natural anesthetic *Cinnamomum zeylanicum* (cinnamon). As for anesthesia and recovery times, the natural anesthetic *Cinnamomum zeylanicum* (cinnamon) had the best results.

Keywords: comet assay, welfare, genotoxicity, stress, stages of anesthesia, stages of recovery, natural anesthetics, anesthesia methods.